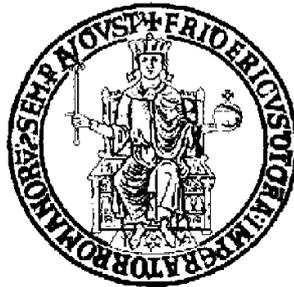


# Università degli Studi di Napoli “Federico II”



FACOLTÀ DI SCIENZE  
MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XXI ciclo

*Suscettibilità dei tessuti di animali ipertiroidi allo stress ossidativo  
in vivo. Ruolo dei mitocondri nello stress ossidativo indotto  
dall'esercizio acuto nel muscolo scheletrico di animali ipertiroidi.*

*Tutor*  
Ch.ma prof.ssa  
Paola Venditti

*Coordinatore*  
Ch.ma prof.ssa  
Amalia Virzo De Santo

*Dottoranda*  
Dott.ssa  
Angela Bari

Anno Accademico 2005/2008

*La cosa più difficile è definire un cammino per noi stessi.  
Chi non compie alcuna scelta, agli occhi del Signore muore,  
anche se continua a respirare e a camminare per le strade.  
Perché l'uomo deve scegliere. In questo sta la sua forza: il  
potere delle sue decisioni.*

**(PAULO COELHO)**

# *PREMESSA*

Gli ormoni tiroidei sono i principali regolatori del metabolismo corporeo, ciò è legato in gran parte alla capacità di tali ormoni di attivare la trascrizione di geni codificanti per gli enzimi e per i carriers elettronici mitocondriali. Tuttavia, l'incremento del contenuto dei componenti della catena di trasporto elettronico mitocondriale, come i citocromi (Horrum *et al.*, 1985) e l'ubichinone (Horrum *et al.*, 1986; Venditti *et al.*, 2003), e l'incremento del loro grado di riduzione (Horrum *et al.*, 1985) provocano come effetto collaterale l'aumento della produzione di radicali liberi e di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS). Questo è dovuto al fatto che nella catena di trasporto mitocondriale, alcuni trasportatori cedono gli elettroni direttamente all'O<sub>2</sub>, anziché al trasportatore successivo, formando il radicale superossido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), il quale mediante una reazione di dismutazione, è convertito a perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Quest'ultimo, reagendo con il Fe<sup>2+</sup>, dà origine al radicale idrossilico ( $\bullet\text{OH}$ ) altamente reattivo capace di danneggiare le molecole biologiche.

Le ROS, infatti, sono capaci di ossidare i lipidi di membrana, innescando una reazione perossidativa a catena; le proteine e gli enzimi, alterando la struttura e la funzionalità; e gli acidi nucleici, causando la rottura e l'alterazione delle basi azotate. La conseguenza dell'azione svolta dalle ROS sulle molecole biologiche determina l'insorgenza di una condizione di stress ossidativo in diversi tessuti. Inoltre, i tessuti degli animali ipertiroidei sono più suscettibili a un ulteriore insulto ossidativo, come dimostrato da studi condotti sottoponendo i tessuti di animali resi sperimentalmente ipertiroidei a una sfida ossidativa *in vitro*. Per esempio, l'ipotesi che il cuore ipertiroideo sia più suscettibile all'insulto ossidativo è stata verificata utilizzando come modello di stress ossidativo *in vitro* l'ischemia-riperfusion. È noto, infatti, che durante la riperfusion di tessuti ischemizzati, si ha un aumento nel rilascio di ROS che possono contribuire al danno tissutale.

Un possibile modello di stress ossidativo *in vivo* è rappresentato dall'attività fisica acuta, durante la quale si verifica l'insorgenza di danno ossidativo tissutale e riduzione della funzionalità mitocondriale a causa di modificazioni biochimiche indotte dalle specie reattive dell'ossigeno, prodotte in quantità elevate durante l'esercizio acuto. Tale modello di stress ossidativo è stato utilizzato per verificare se i tessuti di animali ipertiroidei sono più suscettibili agli insulti ossidativi *in vivo*.

# ***INTRODUZIONE***

## Specie reattive dell'ossigeno

E' ben stabilito che un'importante minaccia all'omeostasi degli organismi aerobici deriva da specie chimiche denominate *radicali liberi*, molecole caratterizzate dalla presenza di uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno e sono normalmente contraddistinte da un'elevata reattività. La loro esistenza fu comprovata sperimentalmente per la prima volta da Gomberg (1900), il quale riuscì ad ottenere il radicale trifenilmetile,  $(C_6H_5)_3C$ . Tuttavia, solo dopo molto tempo fu proposto che i radicali dell'ossigeno e altre specie reattive, potevano formarsi negli organismi viventi come sottoprodotto del normale metabolismo aerobico.

L'ossigeno è una molecola ossidante, che nello stato fondamentale presenta due elettroni spaiati in due orbitali  $\pi$  di antilegame. La presenza di elettroni spaiati lo annovera tra i "*radicali liberi*", e gli conferisce le particolari proprietà di tali molecole, per esempio il paramagnetismo. A differenza di molti altri radicali liberi, l'ossigeno non presenta un'elevata reattività. Infatti, le reazioni in cui esso è coinvolto non si realizzano di norma alle temperature ordinarie o in assenza di catalizzatori sebbene il suo elevato potere ossidante renda la maggior parte delle sostanze d'interesse biologico termodinamicamente instabili in sua presenza. Questa apparente contraddizione è spiegata dalla particolare disposizione elettronica dell'ossigeno nello stato fondamentale, caratterizzata da due elettroni con spin paralleli nei due orbitali più esterni. Questa disposizione richiederebbe, nei processi di ossidazione, la messa a disposizione da parte delle molecole da ossidare di due elettroni con spin fra loro paralleli e opposti a quelli degli elettroni spaiati dell' $O_2$ . Poiché le molecole dei composti organici stabili contengono elettroni di valenza con spin opposti, la necessità di operare l'inversione dello spin prima che gli elettroni siano accettati nell'orbitale dell'ossigeno rallenta o preclude la reazione con tali molecole, fenomeno definito *restrizione di spin*. Un modo per eliminare la restrizione di spin richiede l'intervento di sostanze che hanno la capacità di trasferire, con il giusto verso, uno o più elettroni dalla molecola da ossidare all'ossigeno. Esempi di tali sostanze sono alcuni ioni di metalli di transizione a valenza variabile come il ferro e il rame, che possiedono elettroni spaiati con spin paralleli, ed enzimi, come l'enzima citocromo ossidasi (COX), forniti di ioni metallici nei loro siti attivi. La COX possiede, inoltre, la caratteristica di permettere la cessione graduale di quattro elettroni e di trattenere saldamente legate, nel suo sito attivo, tutte le forme intermedie parzialmente ridotte dell'ossigeno finché questo non subisce una totale riduzione.

Nelle prime tre fasi della reazione, dunque, si formano inevitabilmente forme parzialmente ridotte dell'ossigeno generate nella seguente sequenza: lo *ione superossido* ( $\bullet O_2^-$ ), lo *ione perossido*

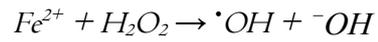
( $O_2^{2-}$ ), che è immediatamente protonato a *perossido d'idrogeno* ( $H_2O_2$ ), *radicale idrossilico* ( $\cdot OH$ ) e infine l'aggiunta del quarto elettrone conduce allo *ione idrossile* ( $\bar{OH}$ ) che è trasformato in acqua dall'aggiunta di un protone. I tre intermedi, in particolare il radicale  $\cdot OH$ , sono molto più reattivi, per tale motivo sono indicati come specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le ROS comprendono anche altre specie tra cui il *radicale alcolossile* ( $RO\cdot$ ), il *radicale perossile* ( $ROO\cdot$ ) e l'*ossigeno singoletto* ( $\cdot O_2$ ).

I radicali liberi si formano costantemente all'interno dell'organismo. La loro produzione può essere innescata nelle cellule da numerosi processi come, ad esempio, l'assorbimento di luce ultravioletta o raggi X, l'introduzione nell'organismo di pesticidi, elementi del fumo della sigaretta, idrocarburi aromatici e altre sostanze. I radicali liberi, però, si formano anche come sottoprodotto di normali processi metabolici. La catena di trasporto elettronico mitocondriale è sicuramente la sorgente produttiva di ROS più importante. Nonostante la COX tenga strettamente legate le forme intermedie di riduzione dell' $O_2$ , altri carriers elettronici possono cedere un solo elettrone all'ossigeno formando il radicale superossido. Si ritiene che circa il 2% dell' $O_2$  consumato dai mitocondri subisca tale riduzione parziale.

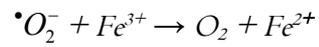
Il radicale superossido, può formarsi anche nel citoplasma per opera dell'enzima xantina ossidasi, coinvolto nella degradazione delle purine. Inoltre, ci sono enzimi associati alla membrana, come le ciclossigenasi e le lipossigenasi, che agiscono nel metabolismo dell'acido arachidonico, la cui ossidazione genera il radicale  $\cdot OH$ . Le ROS sono prodotte anche a livello del reticolo endoplasmatico in seguito a reazioni che portano alla detossificazione di sostanze introdotte nell'organismo anche a scopo terapeutico, come i farmaci. Infine esse possono essere prodotte nei perossisomi, particelle in cui l'ossidazione di sostanze diverse produce come intermedio l'acqua ossigenata.

Durante i normali processi metabolici si ha la formazione dello ione superossido ( $\cdot O_2^-$ ) che, attraverso una serie di reazioni, induce alla formazione degli altri intermedi della riduzione dell'ossigeno, tra cui il perossido di idrogeno. Il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) non è un radicale perché non contiene elettroni spaiati e reagisce lentamente; tuttavia, esso è sempre un agente potenzialmente pericoloso in quanto:

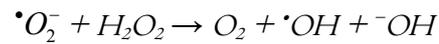
a) attraversa facilmente le membrane cellulari diffondendosi tra i diversi compartimenti cellulari; b) può interagire con i complessi di alcuni ioni metallici di transizione nella forma ridotta come  $Fe^{2+}$  (o  $Cu^{2+}$ ) che lo decompongono nel radicale idrossilico molto reattivo e nello ione idrossilico secondo la seguente reazione (reazione di Fenton):



Poiché la maggior parte del ferro cellulare libero è presente allo stato ferrico ( $Fe^{3+}$ ), questo deve essere ridotto allo stato ferroso ( $Fe^{2+}$ ) prima di partecipare alla reazione e questo può avvenire per azione del superossido:

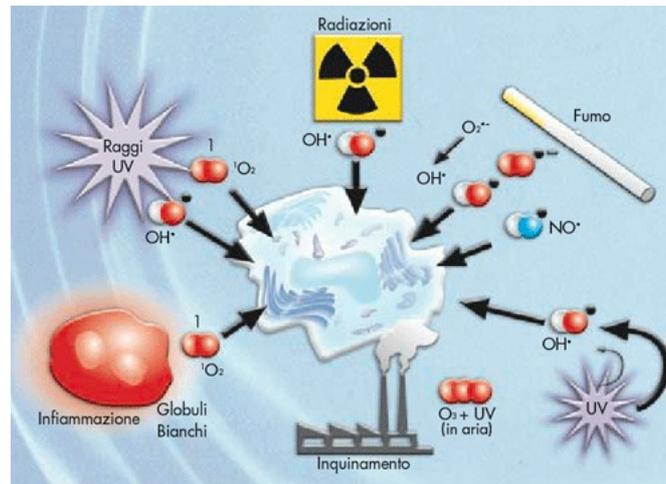


Combinando le due equazioni, si ottiene la *reazione di Haber-Weiss*, in cui il perossido d'idrogeno è ridotto dal superossido, in presenza di quantità catalitiche di ioni metallici:



## Siti di produzione dei radicali liberi

Esistono numerosi fattori chimico-fisici esogeni capaci di indurre la formazione dei radicali liberi nei tessuti biologici, quali il fumo, le radiazioni ionizzanti ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e raggi X), gli antibiotici e agenti tumorali (Figura 1).



**Figura 1:** Fonti esogene di produzione di ROS.

Oltre alle fonti esterne, le ROS sono prodotte all'interno delle cellule in diversi tipi di tessuti; la maggior parte delle specie reattive dell'ossigeno sono prodotte dai mitocondri (Figura 2).



**Figura 2:** I mitocondri rappresentano la principale fonte endogena di produzione di ROS.

In questi organelli, durante la fosforilazione ossidativa, la quasi totalità dell'ossigeno è completamente ridotta a molecola di acqua dall'enzima citocromo ossidasi, utilizzando gli elettroni derivanti dai coenzimi piridinici ridotti (NADH e FADH<sub>2</sub>) attraverso i complessi enzimatici della

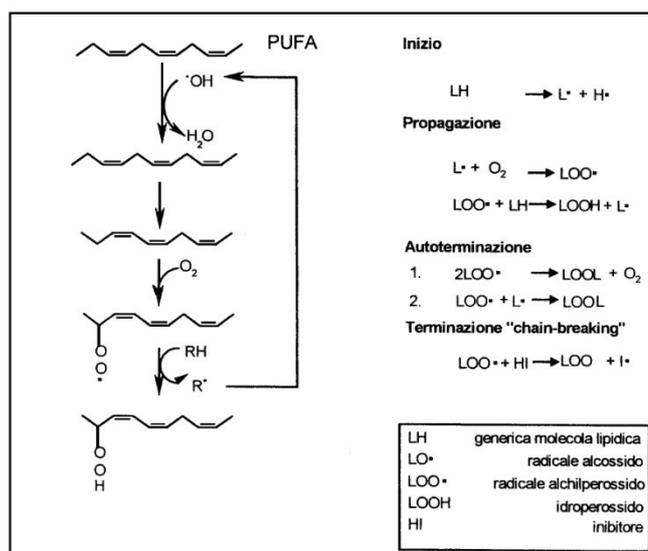
catena di trasporto elettronico mitocondriale. Tuttavia alcuni trasportatori elettronici situati nel complesso respiratorio I e III, sono in grado di cedere un elettrone all'ossigeno formando l'anione superossido, e non essendo capace di trattenerlo, lo rilasciano nel mezzo circostante, al contrario della COX, che trattiene tutte le forme parzialmente ridotte dell'O<sub>2</sub> fino alla sua completa riduzione.

Nella matrice mitocondriale è presente l'enzima superossido dismutasi Mn-dipendente (MnSOD) che converte rapidamente l'anione superossido in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alcuni studi indicano che nei mitocondri è prodotto anche il radicale idrossilico (Nohl *et al.*, 1981). Questa reazione è dovuta alla presenza, nei mitocondri, del radicale superossido, del perossido d'idrogeno e di complessi del ferro che possono fungere da catalizzatori per la reazione di Haber-Weiss.

E' stato stimato che in condizioni normali di funzionamento della catena respiratoria mitocondriale, circa il 98% dell'ossigeno consumato è ridotto completamente a molecola di acqua, mentre solo una piccola percentuale (il 2%) è rilasciata come radicale superossido. La quantità di superossido rilasciata può aumentare, anche notevolmente, quando insorgono modificazioni del sistema di trasporto elettronico mitocondriale. Altri siti di produzione di radicali liberi sono: il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare e i perossisomi, che sono in grado di ridurre l'ossigeno ad acqua attraverso un meccanismo che coinvolge come intermedio l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Loshen *et al.*, 1971).

## Danni da radicali liberi

I radicali liberi reagiscono con numerose molecole biologiche, quali lipidi, proteine e DNA, presenti in una cellula, provocando variazioni ossidative e alterandone, di conseguenza, la struttura e la funzione. Il principale bersaglio delle ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle biomembrane e delle lipoproteine plasmatiche (Halliwell *et al.*, 1990; Kowaltowski *et al.*, 1999). A essere attaccati sono principalmente gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), i quali subiscono un processo a catena, noto come *perossidazione lipidica*, che comporta la loro trasformazione in idroperossidi lipidici (LOOH) e composti aldeidici secondari, come la malondialdeide (MDA) (Gutteridge, 1995) ed il 4-idrossinonale (*4-HNE*). La perossidazione lipidica può essere innescata da una qualsiasi sostanza capace di estrarre un atomo di idrogeno da un gruppo metilenico reattivo di un PUFA, tra cui i radicali ossidrili, alcossilici, perossilici ed alchilici (Figura 3).



**Figura 3:** Sequenza di reazioni della perossidazione lipidica.

La perossidazione lipidica nei tessuti biologici è una reazione autocatalitica, che si svolge secondo le tre fasi tipiche delle reazioni radicaliche:

- induzione
- propagazione
- terminazione

La prima fase è favorita da qualsiasi specie radicalica capace di estrarre un atomo di idrogeno dalla catena alchilica di un lipide (LH). In seguito a tal estrazione si forma un radicale che subisce una parziale stabilizzazione, trasformandosi nel radicale di un diene coniugato. Questo, a sua volta, reagisce con l'ossigeno formando il radicale perossilico (LOO<sup>\*</sup>), il quale può estrarre un idrogeno da un acido grasso adiacente formando, in tal modo, un idroperossido lipidico e propagando il processo di perossidazione. I perossidi lipidici possono andar incontro a un processo di decomposizione da cui si formano alcoli, aldeidi e idrocarburi e che ha come conseguenza la perdita di grassi polinsaturi. Le conseguenze della perossidazione lipidica comprendono la perdita di grassi polinsaturi, che comporta una diminuzione della fluidità delle membrane, con conseguente alterazione della loro permeabilità. Altra conseguenza è la modificazione dell'interazione fra lipidi e proteine associate alle membrane, con conseguente alterazione delle attività enzimatiche e del trasporto ionico. L'alterazione dell'integrità della membrana plasmatica e il conseguente aumento della permeabilità agli ioni Ca<sup>2+</sup> (Vercesi *et al.*, 1997) può portare alla distruzione irreversibile della cellula (Bernardi, 1992).

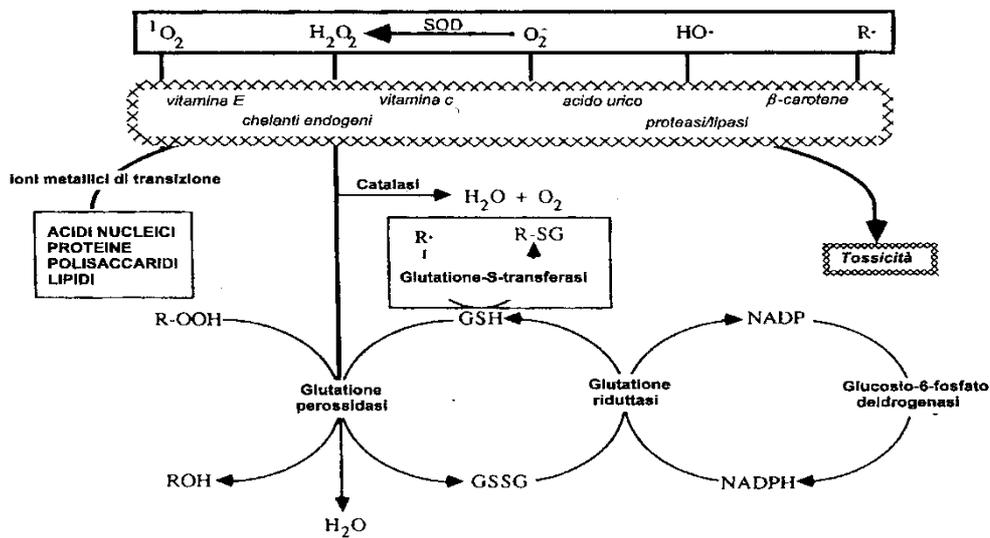
I danni da radicali liberi possono coinvolgere anche le proteine (Kehrer, 1993; Halliwell, 1998). L'ossidazione degli aminoacidi costituenti le proteine da parte dei radicali provoca inattivazione di enzimi, modificazione delle proprietà fisiche e strutturali delle proteine con conseguente frammentazione (Wolff *et al.*, 1986), aggregazione e suscettibilità alla digestione proteolitica (Rivett, 1986; Griffith, 1988). Tra le modificazioni ossidative indotte dai radicali su alcuni aminoacidi proteici, vi è la formazione dei gruppi carbonilici che possono essere utilizzati come markers dell'ossidazione proteica. Questo tipo di alterazione è catalizzato da cationi metallici come Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> che, legandosi a specifici siti sulle proteine e, coadiuvati da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o <sup>\*</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, possono trasformare i gruppi amminici delle catene laterali degli aminoacidi lisina, arginina, prolina, e istidina in gruppi carbonilici.

L'azione dannosa delle ROS può esplicarsi anche a livello del DNA sia nucleare sia mitocondriale; in particolare il radicale ossidrilico è il principale responsabile dei danni sia alle basi puriniche e pirimidiniche, sia allo scheletro del DNA. Infatti, esso può reagire con le basi del DNA modificandole o reagire con lo scheletro di ribosio-fosfato portando alla scissione della doppia elica. Particolarmente suscettibile alle ROS è il DNA mitocondriale, sia perché esso si trova a stretto contatto con un'importante fonte di produzione delle ROS, sia perché esso non è associato, come quello nucleare, a proteine che possono fungere da sistema di cattura per tali specie.

## Antiossidanti

L'organismo, nel corso dell'evoluzione, ha sviluppato meccanismi biochimici per la difesa dei tessuti e delle cellule contro i danni da radicali liberi; in particolare i mitocondri possiedono sistemi di difesa antiossidante molto efficienti. Questi complessi sistemi di difesa sono in grado di agire a diversi livelli: prevenendo la formazione di ROS, intercettando le ROS una volta formate, oppure riparando il danno ossidativo (*Figura 4*).

Un *antiossidante* è una qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l'ossidazione di tale substrato (Halliwell e Gutteridge, 1990).



**Figura 4:** Sistema di difesa antiossidante.

Le strategie di difesa utilizzate contro i radicali liberi da differenti tessuti sono alquanto diverse. Esse dipendono dal tipo cellulare e dallo stato fisiologico e presumibilmente riflettono esigenze nelle funzioni biologiche. In ogni caso i meccanismi di difesa consistono essenzialmente da sistemi di *enzimi antiossidanti e sostanze antiossidanti a basso peso molecolare*, detti “*free radical scavengers*” (Yu, 1994). Essi sono ulteriormente distinti in antiossidanti di tipo *enzimatico* e in antiossidanti *non enzimatici*, costituiti da sostanze a basso peso molecolare, detti “*scavengers*” (spazzini), di derivazione endogena o introdotti nell'organismo con la dieta.

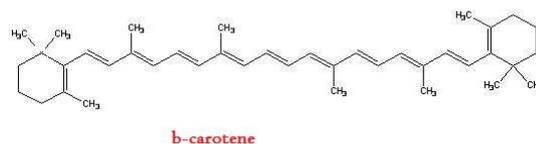
Fra gli enzimi antiossidanti si annoverano:

- Superossido dismutasi (SOD) che catalizza la conversione del superossido in  $H_2O_2$ . Esistono due tipi di SOD: una Mn-dipendente, localizzata nei mitocondri dove interagisce con il superossido derivato dalla catena di trasferimento elettronico. L'altra, Cu e Zn-dipendente, è localizzata nel citosol cellulare, dove svolge una funzione catalitica più generica. Affinchè la protezione da parte della SOD sia valida, è necessario che l' $H_2O_2$  sia immediatamente convertito in  $H_2O$ , impedendo in questo modo che l'intervento dei complessi degli ioni metallici lo trasformi nel radicale idrossilico altamente tossico.
- Catalasi (CAT) che decompone  $H_2O_2$  in acqua e ossigeno. Tal enzima mostra elevata attività nel fegato, nel rene e negli eritrociti e nei mitocondri di cuore; è localizzato in piccole particelle subcellulari denominate perossisomi. L'attività enzimatica della CAT aumenta in concomitanza all'aumento della produzione del perossido di idrogeno.
- Glutatione perossidasi (GPX) rimuove l' $H_2O_2$ , formatosi dalla dismutazione del superossido, utilizzandolo come substrato da ossidare il glutatione. L'enzima GPX è ampiamente distribuito nei tessuti animali, ma è principalmente presente nel citosol, mentre la matrice mitocondriale contiene circa il 10% del totale. La capacità dei sistemi che utilizzano il glutatione per rimuovere l' $H_2O_2$  dipende dall'attività della GPX e dalla concentrazione del GSH; quindi per assicurare la massima efficienza del sistema in ogni momento della vita cellulare, il glutatione ossidato, derivante dalla riduzione del GSH ad opera della GPX, deve essere ridotto a sua volta a mezzo dell'intervento catalitico dell'enzima antiossidante glutatione reduttasi (GR) a spese del NADPH, prodotto nel ciclo dei pentosi-fosfato. L'enzima GR mantiene il rapporto GSH/GSSG a un livello relativamente alto (> 10:1).

Fra gli antiossidanti non enzimatici, distinti in idrosolubili o liposolubili, sono compresi:

- Il  $\beta$ -carotene fa parte di un gruppo di sostanze presenti nelle piante che fungono da precursori delle vitamine A. Studi recenti, hanno suggerito che il  $\beta$ -carotene aiuta nella prevenzione del cancro e che può esercitare questo effetto indipendentemente

dal suo ruolo di precursore della vitamina A.

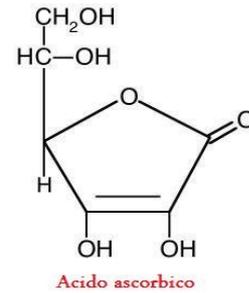


Il  $\beta$ -carotene è un antiossidante solubile nei lipidi

ed uno dei più potenti scavengers dell'ossigeno singoletto nei sistemi biologici, nei quali sono stati trovati diversi isomeri del  $\beta$ -carotene che presentano una diversa reattività biologica.

- L'acido ascorbico, o vitamina C, è considerato il più importante antiossidante nei fluidi extracellulari. In studi effettuati con i lipidi del plasma umano, è stato mostrato che l'ascorbato è molto più efficiente a inibire la perossidazione lipidica di altri componenti del plasma.

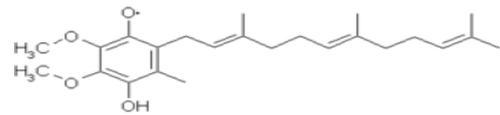
L'ascorbato può proteggere le biomembrane contro il danno perossidativo intrappolando efficacemente i radicali perossilici nella fase acquosa prima che essi avviano il processo perossidativo.



Inoltre, l'ascorbato è in grado di proteggere le membrane biologiche anche attraverso un potenziamento dell'attività dell' $\alpha$ -tocoferolo. È stato, infatti, dimostrato *in vitro* che l'ascorbato riduce il radicale tocoferossile e quindi restaura l'attività di spazzino dei radicali del tocoferolo.

- Il Coenzima Q, o ubiquinone, è un componente di tutte le membrane cellulari dei mammiferi, dove svolge una attività antiossidante che può essere ascritta ad un sinergismo con la vitamina E (Kagan *et al.*, 1990) o ad una diretta attività di scavenger (Ernster *et al.*, 1992).

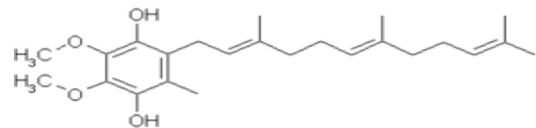
Con il termine *coenzima Q* (ubichinone) si indica un gruppo di composti chimicamente simili alla vitamina E.



Questi composti hanno una struttura basica di anello chinonico a cui sono attaccati 30-50 atomi di carbonio,

come unità isoprenoidi in posizione 6. Il numero di unità isoprenoide varia da 6 a 10. Il coenzima Q agisce come trasportatore di elettroni nella catena respiratoria mitocondriale ed è presente anche in altre membrane cellulari e lipoproteine circolanti.

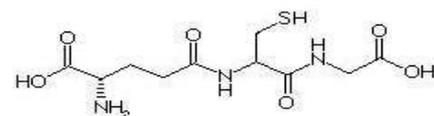
La forma ridotta dell'ubichinone, l'*ubichinolo*, inibisce la perossidazione dei lipidi, agendo come scavenger fenolico dei radicali.



Le sue proprietà antiossidanti sono dovute alla sua capacità di essere ossidato a radicale semichinone, il quale può essere ulteriormente ridotto a ubichinolo attraverso un ciclo redox.

- Il glutathione (GSH), antiossidante idrosolubile, è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente nelle cellule dei mammiferi. La concentrazione

è generalmente di 0.5 mM; esso è in uno stato costante di turnover metabolico, per cui la sua vita media è di soli 4 giorni negli eritrociti umani e di 3 ore nel fegato



di ratto. La principale sorgente di GSH plasmatico è il fegato,

il quale sembra possedere almeno due meccanismi di trasporto e due diversi carriers per esportare il GSH nel plasma e nella bile. Il glutathione è coinvolto in molti processi in cui svolge funzione antiossidante, che sembra essere strettamente legata al suo gruppo tiolico. Esso protegge i tessuti dai

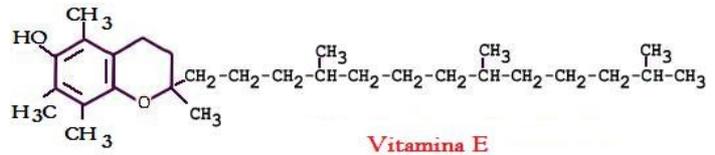
danni provocati dai radicali in maniera diretta, ossia reagendo con le specie radicaliche, oppure in modo indiretto, mantenendo nella forma ridotta sia i gruppi sulfidrilici delle proteine sia di alcuni antiossidanti, come  $\alpha$ -tocoferolo (Yu, 1994).

- La vitamina E, l'antiossidante più abbondante in natura, è dotata di un anello fenolico e una lunga catena isoprenoide, di cui si conoscono almeno otto isomeri strutturali; tra cui l' $\alpha$ -tocoferolo. La vitamina E è una sostanza liposolubile, e l' $\alpha$ -tocoferolo è la forma che viene preferenzialmente

accumulata, essa viene concentrata

nei siti idrofobici delle membrane,

dove svolge la sua azione antiossidante.



La sua attività antiossidante è legata alla capacità di donare il proprio atomo di idrogeno fenolico ai radicali perossilici ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e di interferire con le trasformazioni autocatalitiche della perossidazione lipidica. In seguito a tale reazione l' $\alpha$ -tocoferolo si trasforma in un radicale scarsamente reattivo, si degrada con estrema lentezza ed è riconvertibile in vitamina E mediante l'intervento della vitamina C.

## *Stress ossidativo*

La sopravvivenza degli organismi aerobi in un ambiente ricco di ossigeno richiede una complicata interazione tra la produzione di radicali liberi e la capacità degli organismi di controllare tali sostanze. In condizioni normali, la produzione di radicali liberi è bassa ed è bilanciata dall'azione dei sistemi di difesa antiossidante sopra descritti. In diverse condizioni fisiopatologiche, però, la velocità di produzione dei radicali liberi supera la capacità dei sistemi di difesa cellulare, per cui insorge una condizione nota come stress ossidativo (Sies, 1991).

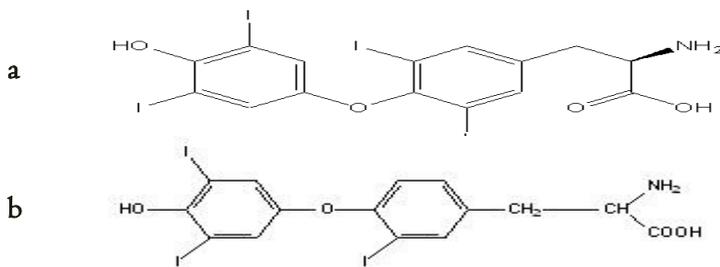
Lo stress ossidativo è, quindi, dovuto a uno squilibrio nel bilancio tra pro-ossidanti e antiossidanti in favore dei primi, e porta inevitabilmente a un danno ossidativo. Infatti, i tessuti in cui si verifica questo squilibrio non sono più in grado di mantenere il normale rapporto GSH/GSSG ed accumulano GSSG. La conseguenza è un'alterazione dello stato ossido-riduttivo intracellulare, l'inattivazione di enzimi che portano gruppi sulfidrilici nei loro siti attivi e la formazione di disolfuri misti intermolecolari o intramolecolari.

Il fenomeno dello stress ossidativo è stato relazionato a numerosi stati fisiopatologici (Kehrer, 1993; Halliwell B. e Gutteridge, 1990). Tra le condizioni che sembrano favorire l'instaurarsi di uno stress ossidativo si annoverano gli stati ipermetabolici, che portano a un aumentato flusso di ossigeno a livello cellulare, come per esempio l'ipertiroidismo.

## Ormoni tiroidei

Gli ormoni tiroidei sono prodotti dalle cellule follicolari della tiroide. Essi sono composti aromatici iodati noti come iodotironine sintetizzati all'interno di una macromolecola proteica, la tireoglobulina, mediante l'unione di due nuclei dell'amminoacido tirosina con lo iodio proveniente dall'alimentazione. La tireoglobulina costituisce circa il 70% della secrezione proteica della cellula follicolare della tiroide, essa è riversata nel lume dei follicoli tiroidei come colloide e ha il significato sia di precursore sia di deposito degli ormoni tiroidei.

I principali ormoni tiroidei sono la tironina ( $T_4$ ) e la triiodotironina ( $T_3$ ) (*Figura 5*). La normale concentrazione plasmatica della  $T_4$  è circa 8  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (103  $\text{nmol}/\text{L}$ ) e quella della  $T_3$  è circa 0,15  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (2,3  $\text{nmol}/\text{L}$ ). La  $T_4$  costituisce il 95-98% degli ormoni circolanti, la  $T_3$  deriva per il 20-30% come tale direttamente dalla tiroide, mentre il 75-80% della  $T_3$  circolante deriva dalla trasformazione metabolica della  $T_4$  che a livello dei tessuti periferici, per opera di sistemi enzimatici, subisce una reazione di deiodinazione dell'anello fenolico esterno (Visser, 1988). L'emivita plasmatica della  $T_4$  è di 6-8 giorni, mentre quella della  $T_3$  è di 1-3 giorni.



**Figura 5:** Struttura molecolare della tiroxina (a) e della triiodotironina (b)

Gli ormoni tiroidei  $T_4$  e  $T_3$  sono secreti in un rapporto 10/1; nel plasma il 99% della  $T_4$  circola legato alle proteine plasmatiche, in particolare il 75% è legato alla TBG (Thyroxine binding globulin), una glicoproteina prodotta nel fegato, il 15-20% è legato alla prealbumina (TBPA) e una piccolissima percentuale di  $T_4$  è legata all'albumina. La  $T_3$ , l'ormone biologicamente attivo, è legata in prevalenza all'albumina e solo in proporzione minore alla prealbumina (Hennemann *et al.*, 1990). La TBPA e l'albumina presentano una bassa affinità per questi ormoni e quindi determinano un rilascio rapido; le globuline, al contrario, mostrano un'elevata affinità per le iodotironine rilasciandole in circolo lentamente. Una quota degli ormoni tiroidei si distacca dalle proteine plasmatiche circolando in forma libera (circa lo 0,2% dell'ormone totale) nel compartimento cellulare, ove le iodotironine svolgono un'azione pressoché ubiquitaria. Il sistema di trasporto plasmatico è considerato come un sistema tampone che trattiene in circolo l'eccesso di ormone

contribuendo quindi alla loro omeostasi nell'organismo, e proteggendo i tessuti da un'ondata ormonale (Pardrige, 1987; Davis, 1970).

Gli ormoni tiroidei sono molecole idrofobiche e per tale motivo, inizialmente, si pensava che la loro traslocazione attraverso il bilayer fosfolipidico avvenisse per diffusione. Evidenze sperimentali ottenute negli ultimi anni hanno mostrato che gli ormoni tiroidei attraversano le membrane cellulari mediante trasportatori (Hennemann *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2002). Nel 2003 Visser e collaboratori hanno clonato il gene di MCT8 di ratto per valutare la sua funzione di trasportatore dell'ormone tiroideo. MCT8 appartiene alla famiglia dei trasportatori monocarbossilati; il gene di tale trasportatore è localizzato sul cromosoma X ed è molto espresso nel fegato e nel cervello, ma si trova anche in altri tessuti. La sua ampia distribuzione si adatta bene con la sua funzione di trasportatore dell'ormone tiroideo poiché tale ormone è essenziale per la regolazione, lo sviluppo e i processi metabolici di molti tessuti (Visser *et al.*, 2003).

## *Ipertiroidismo e stress ossidativo*

Gli ormoni tiroidei esercitano una moltitudine di effetti fisiologici che influiscono sulla crescita, sullo sviluppo e sul metabolismo dei vertebrati (Greenspan, 1994), per tale motivo sono considerati i principali regolatori della loro omeostasi. Gli elevati livelli degli ormoni tiroidei circolanti sono associati a modificazioni dell'intero organismo (perdita di peso, aumentato metabolismo e temperatura) e in diverse regioni del corpo.

Negli animali ipertiroidei si riscontrano bassi livelli di lipidi plasmatici, tachicardia, aritmia striale, insufficienza cardiaca e atrofia. I potenziali siti cellulari di azione dell'ormone tiroideo sono rappresentati dalla membrana plasmatica, dal reticolo endoplasmatico e dai mitocondri (Segal *et al.*, 1982; Cheng *et al.*, 1987; Sterling, 1979). Comunque, è stato provato, che gran parte dell'azione degli ormoni tiroidei è dovuta all'influenza, esercitata mediante recettori nucleari, sulla trascrizione dei geni sensibili alla  $T_3$  (Oppenheimer *et al.*, 1987). I recettori nucleari per gli ormoni tiroidei (TR) appartengono alla famiglia dei fattori nucleari di trascrizione ormone-sensibili. Sono stati identificati due geni per i recettori degli ormoni tiroidei:  $\alpha$  e  $\beta$ . I geni  $\alpha$  e  $\beta$  nell'uomo sono localizzati, rispettivamente, sul cromosoma 7 e 3. Il gene per la forma  $\alpha$ , in seguito a uno splicing alternativo, forma due diversi mRNA e, quindi, due proteine differenti:  $\alpha I$  e  $\alpha 2$ .  $TR\alpha I$  è un recettore completamente funzionale, mentre  $TR\alpha 2$ , non essendo capace di legare l'ormone tiroideo, non può mediarne l'azione. Il gene per la forma  $\beta$ , poiché utilizza due diversi siti di inizio della traduzione, dà origine anch'esso a due proteine recettoriali diverse,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , entrambe completamente funzionali e diverse solo per l'estensione della regione N-terminale. Il  $TR\beta 2$  si trova solo nel cervello, mentre  $TR\alpha I$ ,  $TR\alpha 2$  e  $TR\beta 1$  sono ampiamente distribuiti. I recettori degli ormoni tiroidei regolano la trascrizione di numerosi geni attraverso il reclutamento di complessi corepressori o coattivatori (Robyr *et al.*, 2000; Zhang e Lazar, 2000). In seguito alla somministrazione di  $T_3$ , alcuni geni bersaglio della  $T_3$  sono espressi solo dopo 24-48 ore *in vivo*, tra questi geni ricordiamo il citocromo c (Scarpulla *et al.*, 1986) e il trasfocatore ANT2 (Dümmeler *et al.*, 1996). L'interazione di TR con questi geni bersagli suggerisce l'esistenza di un meccanismo di induzione mediante l'attivazione di fattori intermedi; le proteine probabilmente coinvolte servono proprio come intermedi, e sono rappresentate per esempio dai fattori respiratori nucleari 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) (Scarpulla, 2002) o dal recettore nucleare coattivatore PGC-1 $\alpha$ , dai recettori attivati dalla proliferazione dei perossisomi (PPARs) e dai coattivatori di PPAR $\gamma$ .

Uno dei principali effetti degli ormoni tiroidei consiste nell'aumentare la respirazione mitocondriale (Roodyn *et al.*, 1965, Nishiki *et al.*, 1978) mediante numerosi e complessi

cambiamenti nel numero e nell'attività dei componenti della catena di trasporto elettronico mitocondriale. L'accelerazione del trasporto elettronico mitocondriale associata alla condizione di ipermetabolismo indotta dagli ormoni tiroidei, provoca un aumento nella produzione di forme parzialmente ridotte dell'ossigeno particolarmente reattive (Turrens *et al.*, 1985). I cambiamenti biochimici indotti dagli ormoni tiroidei determinano l'insorgenza di una condizione di stress ossidativo, quale conseguenza di un disturbo nel normale bilancio cellulare tra la produzione di ROS e la capacità di neutralizzare la loro azione. Negli animali ipertiroidici è stato riscontrato un aumento dei livelli degli indici di perossidazione lipidica in diversi tessuti, tra cui il fegato, il cuore e il muscolo scheletrico (Venditti *et al.*, 1997; Venditti *et al.*, 1999). La perossidazione lipidica è stata utilizzata, insieme al danno ossidativo alle proteine e al DNA, come indice di stress ossidativo nei sistemi biologici (Gutteridge, 1995; Pacifici *et al.*, 1990; Shigenaga *et al.*, 1990). Oltre al danno ai lipidi ci sono in letteratura numerosi dati che indicano che l'ipertiroidismo produce anche l'ossidazione delle proteine nel fegato di ratto (Tapia *et al.*, 1999) e nei testicoli (Choudhury *et al.*, 2003), come messo in evidenza dall'aumento nel contenuto di carbonili legati alle proteine.

Il danno ossidativo può dipendere dall'incremento del rilascio di ROS indotto dall'ormone tiroideo. Infatti, i dati disponibili indicano che l'ipertiroidismo determina un aumento della produzione di ROS da parte dei mitocondri di vari tessuti. E' stato accertato che la velocità di produzione di ROS aumenta in proporzione alla velocità del consumo di ossigeno. Questa idea sembra essere supportata dall'osservazione che l'estensione del danno ossidativo, trovato in seguito al trattamento con l'ormone tiroideo (Venditti *et al.*, 2001), all'esposizione al freddo (Barja de Quiroga, 1992), all'esercizio e alla restrizione calorica (Sacher, 1977) sia correlata allo stato metabolico dell'organismo. In effetti, lo stato di ipertiroidismo funzionale, indotto nei mammiferi dall'esposizione al freddo, così come l'ipertiroidismo sperimentale, porta all'aumento della velocità del metabolismo basale (De Martino Rosaroll *et al.*, 1996) che riflette gli aumenti della respirazione cellulare nei tessuti bersaglio della  $T_3$  come il tessuto adiposo bruno, il fegato ed il muscolo scheletrico e cardiaco. La dipendenza della produzione di ROS dal consumo di  $O_2$ , però, richiederebbe che la percentuale totale di elettroni che fluiscono lungo la catena respiratoria per ridurre l' $O_2$  a radicale ossigeno, non sia modificata durante la transizione dalla respirazione basale a quella stimolata da ADP, ma in realtà la produzione di ROS diminuisce quando aumenta la fosforilazione di ADP (stato 3). Infatti, studi in cui è stato utilizzato il succinato, substrato legato al complesso II, hanno dimostrato che la produzione mitocondriale di ROS si arresta dopo l'aggiunta di una quantità di ADP sufficiente a causare la transizione dallo stato 4 allo stato 3 (Loschen *et al.*, 1971; Boveris *et al.*, 1972; Cadenas *et al.*, 1980). Ciò suggerisce che i mitocondri producono radicali liberi in quantità significative solo durante lo stato 4. Questi studi avvalorano l'ipotesi che la velocità

della produzione mitocondriale di ROS è in relazione al grado di riduzione dei carriers elettronici autossidabili (Loschen *et al.*, 1971; Boveris *et al.*, 1973; Boveris *et al.*, 1972); alla luce di ciò, l'aumento della produzione di ROS, trovato nei mitocondri dei tessuti ipertiroidi, potrebbe essere dovuto a un aumento nel contenuto e nel grado di riduzione dei carriers elettronici autossidabili. Questo è in accordo con l'aumento, indotto dalla T<sub>3</sub> del contenuto di trasportatori elettronici.

Altro fattore che influenza il danno ossidativo è un'alterazione del sistema di difesa antiossidante. L'analisi dei singoli componenti del suddetto sistema ha evidenziato che l'ormone tiroideo induce variazioni non bilanciate e spesso opposte nei livelli degli scavengers a basso peso molecolare e nelle attività degli enzimi antiossidanti. Per valutare ulteriormente gli effetti dello stato ipertiroidico sullo stato antiossidante dei tessuti, preparazioni tissutali sono stati sottoposti all'azione *in vitro* di specie radicaliche; in tal modo, è stato mostrato che la capacità antiossidante globale diminuisce nei ratti ipertiroidi. Questo indica che, nonostante lo squilibrio e a volte gli opposti cambiamenti nei componenti individuali del sistema di difesa antiossidante, l'efficacia globale di tale sistema è sostanzialmente ridotto e ciò potrebbe essere una conseguenza dello stress ossidativo (Venditti *et al.*, 1997).

Inoltre, i cambiamenti biochimici indotti dall'ormone tiroideo aumentano la suscettibilità dei tessuti allo stress ossidativo, come dimostrato dal fatto che la condizione di ipertiroidismo è associata anche all'aumento dell'epatotossicità di una varietà di sostanze come il lindano, il tetracloruro di carbonio e il cloroformio, la cui azione tossica è collegata allo sviluppo di una condizione di stress ossidativo (Videla, 2000). Per verificare la ridotta capacità dei tessuti ipertiroidi di fronteggiare l'insulto ossidativo, è stato utilizzato come modello di stress ossidativo l'ischemia – riperfusione. Durante l'ischemia – riperfusione, condizione sperimentale in cui si ha un aumento della produzione di ROS, i cuori degli animali ipertiroidi mostravano un ridotto recupero funzionale rispetto ai cuori degli animali eutiroidi. Poiché l'ischemia – riperfusione provoca una riduzione delle capacità antiossidanti del miocardio e un aumento della perossidazione lipidica, l'incremento della disfunzione contrattile durante la riperfusione è stato attribuito a un aumento del danno ossidativo. Questa ipotesi è stata avvalorata dall'osservazione che la riduzione della capacità antiossidante e l'aumento della perossidazione lipidica sono prevenuti nei cuori di ratti ipertiroidi trattati con la vitamina E (Venditti *et al.*, 2000). La ridotta capacità funzionale dei tessuti è conseguenza della disfunzione mitocondriale; infatti, il danno inflitto dalle ROS sui mitocondri di cuore durante l'ischemia – riperfusione può dipendere dalla ridotta capacità da parte dei mitocondri stessi di sintetizzare ATP, con conseguente diminuzione nella capacità omeostatica dei tessuti di adattarsi agli effetti destabilizzanti esterni e interni. Una prova a favore di tale teoria è stata fornita

dall'indagine sul ruolo dei mitocondri nel danno da ischemia – riperfusione del miocardio. È stato dimostrato che nei mitocondri di cuori riperfusi, l'estensione dei processi perossidativi aumenta gradualmente con la durata dell'ischemia (Venditti *et al.*, 2001), mentre la capacità antiossidante globale e la resistenza ossidante esibiscono una riduzione significativa, probabilmente dovuta alla deplezione del GSH, solo dopo la riperfusione che segue 45 minuti di ischemia. Inoltre, è stato dimostrato che, dopo la riperfusione del cuore ischemico, il recupero funzionale del tessuto era inversamente proporzionale al danno mitocondriale (Venditti *et al.*, 2001). Il basso recupero mostrato dai cuori ipertiroidici dipende dalla ridotta capacità dei mitocondri di rigenerare ATP; infatti, l'ischemia – riperfusione causa sia un ingente danneggiamento della respirazione mitocondriale sia un più basso recupero funzionale rispetto ai cuori eutiroidici. Inoltre, l'analisi dei cambiamenti mitocondriali legati alla riperfusione mostrava che il declino funzionale dei mitocondri durante la reossigenazione era dovuto allo stress ossidativo, che era maggiore nei cuori ipertiroidici (Venditti *et al.*, 2002).

Fernández e i suoi collaboratori (Fernández *et al.*, 1997) individuarono un altro effetto dovuto all'ormone tiroideo; infatti, essi dimostrarono che la somministrazione di  $T_3$  causa un progressivo aumento dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) nel fegato di ratto, che determina di conseguenza un'aumentata produzione di ossido nitrico ( $NO^*$ ). È stato anche suggerito che la produzione di  $^*O_2^-$  e di  $NO^*$  indotta dall'ormone tiroideo, probabilmente, porta alla formazione del perossinitrito, che può contribuire a incrementare la condizione pro-ossidante provocata dall'ipertiroidismo (Ignarro, 2000).

In vivo un possibile modello di stress ossidativo è rappresentato dall'esercizio aerobico prolungato.

### Esercizio acuto e stress ossidativo

È noto da tempo che un esercizio moderato effettuato con regolarità ha effetti benefici, mentre l'esercizio acuto a lungo termine può determinare lo sviluppo di danni significativi in diversi tessuti, quali fegato (Alessio *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1982; Venditti *et al.*, 1996), cuore (Kumar *et al.*, 1992; Venditti *et al.*, 1996) e muscolo scheletrico (Alessio *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1982; Venditti *et al.*, 1996).

L'entità del danno tessutale dipende principalmente dall'intensità e dalla durata dell'esercizio; il danno alle fibre muscolari dipende da come il muscolo è utilizzato e dal tipo di contrazioni; infatti, il danno indotto da una contrazione di tipo eccentrico è molto più severo rispetto a quello che si osserva in seguito a contrazioni isometriche o concentriche (McCully *et al.*, 1985). Molti studi hanno suggerito che i radicali liberi sono coinvolti nel danno al muscolo e agli altri tessuti, anche se i potenziali siti di produzione di radicali liberi e l'importanza dei loro effetti possono notevolmente variare con il tessuto e il tipo di esercizio. Le prove dirette della produzione cellulare di ROS durante l'esercizio sono scarse, ma nonostante ciò, ci sono in letteratura numerosi dati che forniscono prove dirette dell'insorgenza dello stress ossidativo durante l'esercizio (Davies *et al.*, 1982).

I risultati più interessanti derivano dagli studi sulla perossidazione lipidica e dai cambiamenti dello stato redox cellulare. I lipidi, le proteine e il DNA danneggiati ossidativamente sono stati utilizzati come indici di stress ossidativo nei sistemi biologici (Pacifci *et al.*, 1990; Shigenaga *et al.*, 1990). Molti studi hanno mostrato un incremento della perossidazione lipidica in vari tessuti, come nel muscolo scheletrico (Davies *et al.*, 1982; Alessio *et al.*, 1988; Venditti *et al.*, 1997), cardiaco (Venditti *et al.*, 1996; Rajguru *et al.*, 1993) e nel fegato in seguito all'esercizio acuto (Davies *et al.*, 1982; Alessio *et al.*, 1988; Venditti *et al.*, 1996; Venditti *et al.*, 1997). Inoltre, la scoperta che un effetto protettivo dell'allenamento sia associato all'incremento delle difese antiossidanti cellulari e che i nutrienti antiossidanti prevengano il danno mediato dall'esercizio, è coerente con l'osservazione che lo stesso danno sia indotto da un'eccessiva produzione di ROS.

Il glutatione ridotto (GSH), un tripeptide contenente un gruppo tiolico, riveste un ruolo vitale nel mantenimento dello stato redox delle cellule e nella protezione dei tessuti dallo stress ossidativo (Meister *et al.*, 1983). Molti studi hanno mostrato che l'esercizio esaustivo prolungato promuove l'ossidazione del GSH nella forma GSSG, nel sangue, nel fegato, nel cuore e nel muscolo scheletrico. I meccanismi di stress ossidativo indotto dall'esercizio sono correlati all'aumento di produzione di ROS la cui produzione è associata al consumo di O<sub>2</sub>, ciò è stato confermato

dall'osservazione che l'aumento del consumo di O<sub>2</sub>, che si verifica durante un'intensa attività fisica, porta allo sviluppo di una condizione di stress ossidativo (Tyler, 1992; Barja de Quiroga, 1992). Sono state identificate diverse fonti intracellulari di radicali liberi, compresi i fagociti, gli enzimi ossidasi solubili, gli enzimi ossidativi dei perossisomi e la catena di trasporto mitocondriale (Keher, 1993). Sebbene tutte queste fonti possano essere attivate durante l'esercizio, la catena di trasporto elettronico mitocondriale è considerata la principale sorgente di ROS durante l'esercizio, così come a riposo. Infatti, durante il trasferimento degli elettroni all'O<sub>2</sub> per ridurlo ad acqua nella reazione catalizzata dalla COX, si può verificare un trasferimento diretto di elettroni all'O<sub>2</sub>, anziché al carrier elettronico successivo, generando in tal modo il radicale superossido ( $\bullet O_2^-$ ) che attraverso una dismutazione enzimatica (SOD) produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Durante l'esercizio si verifica anche un aumento della respirazione mitocondriale. Il principale parametro che controlla la respirazione cellulare è costituito dai livelli di nucleotidi adenilici citosolici. Con l'aumento del lavoro muscolare il consumo di ATP è alto e aumenta la concentrazione di ADP che stimola la fosforilazione ossidativa mitocondriale (Bangsbo *et al.*, 1993). Come già accennato, se la produzione di ROS dipendesse dal consumo di O<sub>2</sub> si dovrebbe avere un aumento di produzione di  $\bullet O_2^-$  durante la fase 3 della respirazione, invece, durante lo stato 3 della respirazione la produzione di ROS è minore rispetto a quella dello stato 4. Quest'osservazione non cambia l'ipotesi che lo stress ossidativo indotto dall'esercizio sia dovuto all'aumento di produzione di ROS mitocondriale. Infatti, altre modificazioni che avvengono durante l'esercizio possono incrementare la capacità mitocondriale di produrre radicali liberi. Infatti, l'esercizio acuto riduce gradualmente l'attività della Ca<sup>2+</sup>-ATPasi del reticolo sarcoplasmatico (Byrd *et al.*, 1989) ed incrementa il contenuto citoplasmatico di Ca<sup>2+</sup> (Westerblad *et al.*, 1991). L'eccesso di Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico può indurre un accumulo nei mitocondri determinando, di conseguenza, l'insorgenza di un disaccoppiamento della respirazione attraverso l'apertura di pori permeabili ai protoni nella membrana mitocondriale interna (McCormack *et al.*, 1990). Un tale aumento di Ca<sup>2+</sup> mitocondriale porta a uno swelling (rigonfiamento) dei suddetti organelli cellulari, osservato da Gollinck e King (1969) nel muscolo gastrocnemio di ratto.

Brooks *et al.* (1971), hanno osservato che l'esercizio fisico può portare a un aumento della temperatura fino a 45°C. A questa temperatura i mitocondri di muscolo subiscono un progressivo disaccoppiamento della respirazione che è correlato con la produzione mitocondriale di ROS (Salo *et al.*, 1991). Quindi è stato suggerito che il disaccoppiamento mitocondriale causato dall'ipertermia dia origine all'aumento della produzione di ROS.

Comunque, il disaccoppiamento mitocondriale non può da solo causare l'incremento di produzione di ROS ma richiede la presenza di un inibitore sulla catena respiratoria (Nègre-Salvayre *et al.*, 1999; Boveris *et al.*, 1973; McCormack *et al.*, 1990). Sjödin (1990) ha proposto un meccanismo di produzione di ROS durante l'esercizio basato sulla perdita dell'attività della COX con conseguente aumento della pressione degli elettroni nella catena di trasporto elettronico (aumento del grado di riduzione). Tuttavia è stato possibile valutare la riduzione dell'attività della COX durante l'esercizio. Comunque si possono verificare variazioni nella respirazione anche come conseguenza dell'azione di specie reattive dell'azoto non solo sulla COX ma anche su trasportatori situati a monte della COX. Infatti, l'ossido nitrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) ed il suo potente derivato ossidato perossinitrito ( $\text{ONOO}^{-}$ ), il prodotto della reazione tra  $\bullet\text{O}_2^{-}$  e di  $\text{NO}^{\bullet}$ , sono specie ritenute responsabili dell'alterazione della funzione mitocondriale, come dimostrato dall'inibizione del consumo di ossigeno dal  $\text{NO}^{\bullet}$  (Boritaite *et al.*, 1996) e dal  $\text{ONOO}^{-}$  (Radi *et al.*, 1994). Infatti, l'ossido nitrico è in grado di inibire in modo reversibile l'enzima citocromo ossidasi, mentre il perossinitrito causa una lenta e irreversibile inibizione di molti componenti mitocondriali differenti dal citocromo  $\text{aa}_3$  (Cassina *et al.*, 1996).

In conclusione, dal momento che l'esercizio acuto provoca una condizione di stress ossidativo dovuta all'aumento della produzione di ROS in particolare da parte dei mitocondri, può essere considerato un adeguato modello di stress ossidativo *in vivo*.

## *Eterogeneità della popolazione mitocondriale*

I mitocondri, oltre ad essere la principale sorgente di ROS, rappresentano anche il loro principale bersaglio di azione. (Di Meo *et al.*, 2001).

Da diverso tempo è noto che la popolazione mitocondriale è eterogenea e mediante centrifugazione differenziale, tecnica che permette di separare i componenti cellulari in base alla densità, è possibile isolare dall'omogenato tissutale una subpopolazione pesante ed una leggera aventi caratteristiche morfologiche, biochimiche e funzionali diverse (Lanni *et al.*, 1996; Venditti *et al.*, 1996).

La determinazione degli enzimi marker e l'analisi dell'enzima ATPasi oligomicina - sensibile ha mostrato che la frazione pesante è pura, mentre quella leggera è contaminata da organelli cellulari quali perossisomi, lisosomi e microsomi. Osservazioni al microscopio elettronico hanno evidenziato che la subpopolazione pesante è costituita da mitocondri di grandi dimensioni, mentre quella leggera è formata da mitocondri di piccole dimensioni e da mitocondri danneggiati, che derivano probabilmente dalla degradazione dei mitocondri della frazione pesante (Lanni *et al.*, 1996).

Dagli studi sull'eterogeneità della popolazione mitocondriale si evince che esistono differenze tra le frazioni mitocondriali. Innanzitutto, le frazioni più pesanti hanno capacità funzionali maggiori come dimostrato dal maggiore consumo di ossigeno e dalla maggiore attività dell'enzima COX, la cui attività è correlata con la massima capacità respiratoria (Simon *et al.*, 1971), ma è caratterizzata anche da un maggiore contenuto di citocromi ed è dotata di minore difese antiossidanti (Venditti *et al.*, 1996), a questa condizione consegue una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo. Le frazioni più pesanti producono ROS con velocità maggiore rispetto a quelle più leggere come dimostrato nelle frazioni isolate dal fegato di ratto. Nel tessuto epatico sono state isolate tre sottopopolazioni mitocondriali, una pesante a 1000 g ( $M_1$ ); una intermedia a 3000 g ( $M_3$ ) e una leggera a 10000 g ( $M_{10}$ ) (Lanni *et al.*, 1996; Venditti *et al.*, 1996). Anche dal cuore e dal muscolo scheletrico sono state isolate frazioni mitocondriali pesanti e leggere; infatti, studi condotti a livello ultrastrutturale sui due tessuti hanno suggerito che ai mitocondri con strutture normali sono spesso associati mitocondri danneggiati caratterizzati da una disorganizzazione interna.

La dimostrazione dell'esistenza di mitocondri leggeri con un'attività respiratoria e un contenuto di citocromi più bassi di quelli trovati nelle altre frazioni fornirebbe una prova all'ipotesi che nella cellula esiste un ciclo di maturazione e crescita mitocondriale che dai mitocondri leggeri neoformati porta a mitocondri maturi di grosse dimensioni con elevate capacità ossidative (Lanni *et al.*, 1996). Secondo questa ipotesi i mitocondri della frazione pesante avrebbero origine dai

mitocondri leggeri attraverso un processo di maturazione, al fine di costruire una catena respiratoria adeguata che consenta una sintesi efficiente di ATP. Invece, i mitocondri danneggiati della frazione leggera deriverebbero dalla degradazione dei mitocondri della frazione pesante, caratterizzati quindi da un elevato contenuto di citocromi ma da una bassa funzionalità. Tutto ciò suggerisce l'esistenza di un turnover proteico mitocondriale.

Non è ben noto il meccanismo mediante il quale è regolata la degradazione dei mitocondri pesanti e la formazione delle strutture più leggere. Risultati ottenuti negli ultimi anni portano a ritenere che le ROS, che si formano come sottoprodotto del normale metabolismo cellulare, giochino un ruolo di primo piano nella dinamica della popolazione mitocondriale. Infatti, se l'azione del sistema di difesa antiossidante è insufficiente, i mitocondri attivano il processo di mitoptosi mitocondriale, mediato dal poro di transizione di permeabilità (*MPT*) e indotto dalle ROS. Il poro di transizione di permeabilità è un megacanal che si origina dall'interazione di proteine localizzate nel citosol, nella membrana mitocondriale esterna e interna e nella matrice. È interessante notare che il poro di transizione di permeabilità permette l'ingresso nella matrice di molecole ad alto peso molecolare. Di conseguenza, per mantenere il bilancio osmotico tra la matrice e lo spazio intermembrana, vi è un ingresso di acqua che causa lo swelling mitocondriale. Come risultato, la membrana esterna si rompe poiché la sua area è più piccola di quella della membrana interna (Skulacev, 1996). La perdita dell'integrità della membrana mitocondriale esterna è il primo passo verso la loro degradazione ed eliminazione. Quindi tale processo potrebbe servire a purificare il tessuto da mitocondri che producono un'elevata quantità di ROS limitando il danno ossidativo epatico in animali esposti alle basse temperature ambientali. Nell'ambito di questa ipotesi, la degradazione della frazione pesante sarebbe favorita dall'aumento del contenuto di componenti della catena respiratoria. Tale incremento, infatti, potrebbe provocare un aumento della velocità di produzione di ROS e della suscettibilità dei mitocondri agli ossidanti. Un aumento del contenuto di citocromi, infatti, è associato a un aumento del consumo di O<sub>2</sub>, che determinerebbe a sua volta un incremento delle specie reattive dell'ossigeno. Parte dei radicali liberi prodotti sarebbe intercettata dai sistemi scavengers, ma la riduzione dei sistemi di difesa antiossidante aumenterebbe la suscettibilità dei mitocondri allo stress ossidativo. Questa può avere implicazioni importanti nella regolazione del turnover proteico poiché l'attacco dei radicali liberi alle proteine può portare alla loro degradazione attraverso svariati meccanismi (Stadtman., 1986; Wolff, 1986). Ciò suggerisce che la maturazione mitocondriale, legata a un incremento dei livelli dei componenti della catena respiratoria, produce le condizioni per la degradazione mitocondriale.

# *SCOPO DELLA TESI*

Il lavoro effettuato durante il mio dottorato di ricerca è stato articolato in diverse fasi. Nella prima fase ho verificato se la somministrazione di ormone tiroideo inducesse nel tessuto epatico, cardiaco e muscolare, oltre a una condizione di stress ossidativo, anche un incremento della suscettibilità agli insulti ossidativi *in vivo*. Come modello di stress ossidativo *in vivo* è stato utilizzato l'esercizio aerobico prolungato.

Il danno ossidativo e la funzione tissutale sono stati valutati misurando, rispettivamente, i livelli dei markers di danno ossidativo ai lipidi e alle proteine di membrana e le capacità respiratorie. Inoltre, è stata valutata anche la suscettibilità dei tessuti *in vitro*, sottoponendo preparati tissutali all'azione diretta degli ossidanti *in vitro* tramite una tecnica di chemiluminescenza potenziata. Sono state successivamente valutate le capacità antiossidanti dei tessuti in esame misurando i livelli di Coenzima Q, vitamina E, glutatione ridotto (GSH), e l'attività degli enzimi antiossidanti glutatione perossidasi (GPX) e glutatione reduttasi (GR).

Nella seconda fase, verificato che l'ipertiroidismo induce una maggiore suscettibilità agli insulti ossidativi nei tessuti di animali esercitati, e sapendo che la riduzione della funzionalità cellulare è correlata con la disfunzione dei mitocondri, sono stati indagati i possibili meccanismi posti alla base dell'insorgenza dello stress ossidativo. A tale scopo ho valutato gli effetti dell'esercizio acuto sulla popolazione mitocondriale di muscolo scheletrico, il tessuto principalmente coinvolto nell'esercizio, di ratti eutiroidei e ipertiroidi misurando le capacità respiratorie e la velocità di rilascio dell' $H_2O_2$ . Poiché i mitocondri, oltre a essere la principale sorgente di ROS, rappresentano anche il principale bersaglio della loro azione, è stata valutata l'entità del danno ossidativo ai lipidi e proteine mitocondriali e la capacità dei mitocondri di limitare gli effetti dannosi delle ROS, misurando il contenuto di vitamina E e GSH.

Infine, per verificare se l'ipertiroidismo e l'esercizio acuto modificano le caratteristiche biochimiche della popolazione mitocondriale, sono state isolate mediante centrifugazione differenziale una frazione mitocondriale pesante e una leggera, e ho verificato se l'esercizio modifica il contenuto percentuale di ciascuna frazione misurando l'attività dell'enzima citocromo ossidasi nel muscolo scheletrico e nelle frazioni mitocondriali.

*MATERIALI*  
&  
*METODI*

## Animali

Per la realizzazione degli esperimenti riportati in questo elaborato, sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar. Gli animali, forniti allo svezzamento (45 giorni di età) dalla ditta Nossan (Correzzana, Italia), sono stati stabulati uno per gabbia, con un ciclo circadiano di illuminazione artificiale (12 ore di luce e 12 ore di buio) e nutriti *ad libitum* con un mangime commerciale per ratti acquistato dalla stessa ditta Nossan.

Gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi: ratti eutiroidei sedentari (ES), ratti eutiroidei esercitati (EE), ratti ipertiroidei sedentari (HS) e ratti ipertiroidei esercitati (HE).

La condizione di ipertiroidismo è stata indotta sperimentalmente mediante somministrazione per 10 giorni, dall'età di 110 giorni a quella di 120 giorni, di 3,5,3'-triiodotironina, T<sub>3</sub> (nella dose di 50 µg/100 g di peso corporeo) tramite iniezioni intraperitoneali.

I ratti esercitati sono stati sottoposti ad attività fisica acuta, cioè sono stati sottoposti a una sessione di nuoto della durata massima di sei ore, o fino a esaurimento, con un peso alla coda pari al 2% del loro peso corporeo all'interno di un recipiente di plastica alto 100 centimetri, riempito fino all'altezza di 45 centimetri circa di acqua alla temperatura compresa tra 35-36 °C. La condizione di esaurimento era intesa come il momento in cui il ratto restava sotto la superficie dell'acqua per almeno 10 secondi per tre volte di seguito. Subito dopo i ratti sono stati sacrificati tramite decapitazione, previa anestesia con etere. I ratti ES e HS sono stati sacrificati con le stesse modalità in condizioni di riposo. Tutti i ratti sono stati sacrificati a 120 giorni di età.

### *Procedure sperimentali*

Da ciascun animale sono stati prelevati campioni di sangue arterioso per valutare, mediante saggio radioimmunologico (RIA test), i livelli plasmatici di triiodotironina (FT<sub>3</sub>) e tiroxina (FT<sub>4</sub>) libere. I tessuti fegato, cuore e muscolo, sono stati rimossi e posti in beakers contenenti un mezzo di omogenizzazione (HM) (mannitolo 220mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, Tris 10 mM, e contenente albumina serica bovina (BSA) 0,1 %, pH 7,4), sono stati ripuliti dal connettivo, pesati e tagliuzzati.

I frammenti di tessuto sono stati omogeneizzati nella stessa soluzione (1:5 peso/volume) utilizzando un omogenizzatore Potter-Elvehjem ad una velocità standard di 500 rpm per un minuto. Aliquote degli omogenati sono state conservate per le determinazioni biochimiche. Il cuore, inoltre, è stato utilizzato per valutare il rapporto peso cuore/peso corpo.

### *Isolamento dei mitocondri di muscolo scheletrico*

Le frazioni mitocondriali sono state isolate mediante una procedura che consente di ottenere frazioni poco contaminate da altri organelli citoplasmatici (Lanni *et al.*, 1996). Gli omogenati sono stati sottoposti a una centrifugazione preliminare a 500 g per 10 minuti a 4°C per ottenere la sedimentazione dei nuclei e dei frammenti tissutali. Il supernatante è stato in seguito centrifugato a 3000 g per 10 minuti a 4°C. I pellets risultanti sono stati in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, a pH 7,4 e risospesi nella stessa soluzione e utilizzati per le determinazioni biochimiche.

Per studiare se il trattamento con T<sub>3</sub>, o l'esercizio, modifica la composizione della popolazione mitocondriale totale, è stata isolata anche un'altra frazione mitocondriale (M<sub>8</sub>) mediante una successiva centrifugazione a 8000 g del supernatante ottenuto in seguito alla prima centrifugata a 3000 g. La frazione M<sub>8</sub> conteneva sia i mitocondri danneggiati sia i mitocondri neoformati.

Su entrambe le sottopopolazioni è stato determinato il contenuto proteico, l'attività della citocromo ossidasi, ed i livelli di idroperossidi lipidici. Sulla frazione M<sub>3</sub> sono state eseguite altre procedure analitiche.

### *Dosaggio proteico*

Il contenuto di proteine nelle frazioni mitocondriali è stato determinato con il metodo del biuretto (Gornall *et al.*, 1949) dopo solubilizzazione dei campioni in deossicolato 0,5% usando albumina serica bovina (BSA) come standard.

### Attività dell'enzima citocromo ossidasi

La citocromo ossidasi, ultimo enzima della catena respiratoria mitocondriale, è direttamente responsabile della riduzione dell'O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O. La sua attività, *in vitro*, è stata positivamente correlata alla massima attività aerobica tissutale e mitocondriale (Simon *et al.*, 1971).

L'attività della COX è stata determinata polarograficamente a 30° C mediante l'utilizzo di un ossigrafo Hansatech, dotato di elettrodo Clark per l'ossigeno, utilizzando una modificazione (Barrè *et al.*, 1987) della procedura di Aulie e Grav (1979). I campioni di omogenato (1:5) sono stati diluiti con uguale volume di soluzione di Chappel-Perry 2x (ATP 1 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM) ottenendo in tal modo degli omogenati alla concentrazione di 1 g/10 mL. Quindi, uguali volumi di omogenati 1:10 e di una soluzione di Chappel-Perry contenente Lubrol PX alla concentrazione di 10 mg/mL sono stati mescolati e incubati per 30 minuti a 0°C per smascherare l'attività dell'enzima.

Per determinare, invece, l'attività della COX delle frazioni mitocondriali, sospensioni di tali organelli, a concentrazione proteica nota, sono stati inizialmente diluiti in soluzione di Chappel-Perry 10x. Quindi, ai campioni così diluiti è stato aggiunto un volume di una soluzione di Lubrol (1,5 mg/mL) in soluzione di Chappel-Perry in modo da avere 0,25 mg di Lubrol per mg di proteine mitocondriali. La quantità di sospensione mitocondriale da utilizzare nella determinazione è stata calcolata tenendo conto che, nella camera di reazione, dovrà essere presente una concentrazione finale di 0,2 mg/mL di proteine mitocondriali.

In seguito, nella camera di reazione sono stati introdotti 1,5 mL di una soluzione contenente citocromo c 30 µM, rotenone 4 µM, 2,4-dinitrofenolo 0,5 mM, Na-malonato, 10 mM, HEPES buffer 75 mM, a pH 7,4 cui sono stati aggiunti 100 mg/mL di tessuto oppure 0,2 mg/mL di proteine mitocondriali. Dopo la stabilizzazione dello strumento, l'attività enzimatica è stata misurata come differenza tra il consumo di O<sub>2</sub>, osservato dopo l'aggiunta nella camera di reazione del substrato (Na-Ascorbato 400 mM e di N,N,N',N'- tetrametilparafenildiammina), e la quantità di O<sub>2</sub> consumato, osservato dopo l'aggiunta del solo substrato, in modo tale da tenere in conto l'auto-ossidazione dell'ascorbato.

L'attività della COX è stata espressa come  $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{g tessuto}$  e  $\mu\text{mol O}/\text{min}/\text{mg di proteine mitocondriali}$ .

### Consumo di ossigeno

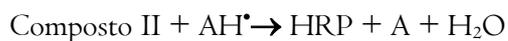
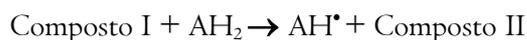
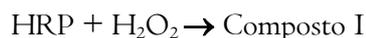
La respirazione tissutale e mitocondriale è stata monitorata a 30°C mediante l'utilizzo di un ossigrafo Hansatech, dotato di elettrodo Clark per l'ossigeno. La miscela di reazione era costituita da 1,6 mL di soluzione di incubazione (KCl 145 mM, Hepes 30 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4) contenente albumina serica bovina allo 0,1%, con 0,25 mg di proteine mitocondriali per millilitro. L'aggiunta del campione ha provocato una temporanea diminuzione della concentrazione di ossigeno in soluzione dovuto al consumo dei substrati endogeni (fase 1). Dopo la stabilizzazione dello strumento è stato aggiunto substrato in eccesso, in modo da provocare un costante e prolungato consumo di ossigeno (fase 2). Il consumo di ossigeno in questa fase serve al mantenimento del potenziale della membrana che tende a cadere in quanto la membrana interna mitocondriale non è completamente impermeabile ai protoni ed una certa aliquota di questi riesce a passare nella matrice mitocondriale anche se i mitocondri sono integri.

Sono stati utilizzati, come substrati respiratori, il succinato (10 mM), che produce equivalenti riducenti ( $\text{FADH}_2$ ) ossidati a livello del complesso II o il piruvato/malato (10/2,5 mM), che producono equivalenti riducenti (NADH), che entrano nella catena respiratoria a livello del complesso I. In seguito sono stati aggiunti al mezzo di reazione 10  $\mu\text{L}$  di ADP 20 mM con un immediato e brusco aumento del consumo di ossigeno (fase 3) che declinava quando tutto l'ADP era stato consumato fino a tornare ai livelli caratteristici della fase 2 (fase 4). Il rapporto del controllo della respirazione (RCR), cioè il rapporto tra il consumo di ossigeno in fase 3 e quello in fase 4, è stato calcolato con il metodo di Estabrook (1967).

I risultati sono espressi come  $\mu\text{moli O}/\text{min}/\text{g}$  di tessuto e  $\mu\text{moli O}/\text{min}/\text{mg}$  di proteine mitocondriali.

### Rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Allo scopo di valutare quantitativamente il rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte di enzimi citoplasmatici o di organuli cellulari (mitocondri, perossisomi, microsomi) esistono diverse tecniche analitiche che sfruttano le proprietà della perossidasi di rafano (HRP). Questo enzima catalizza l'ossidazione di numerosi substrati donatori di idrogeno (AH<sub>2</sub>) in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, secondo le reazioni :



I donatori di idrogeno utilizzati sono sostanze che diventano fluorescenti reagendo con il composto I, o che perdono la fluorescenza in seguito a tale reazione. Sostanze dotate di tali caratteristiche sono la diacetildicloro-fluorescina, acido para-idrossifenilacetico (PHPA) e il loro utilizzo consente una valutazione del rilascio mitocondriale di perossido di idrogeno. Nei nostri esperimenti è stato utilizzato il PHPA, date le sue ottime caratteristiche funzionali. Esso in forma ridotta non è fluorescente, ma in seguito ad ossidazione catalizzata da HRP, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si converte nel composto stabile 2,2'-diidross-difenil-5,5'-diacetato (PHPA)<sub>2</sub> (Hyslop; Sklar, 1984) che è fluorescente. La velocità di formazione di tale composto, e quindi dell'aumento della fluorescenza, è strettamente associata alla velocità di rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dei mitocondri.

Per seguire la fluorescenza generata dalla reazione di ossidazione del PHPA, è stato utilizzato un fluorimetro Jasco dotato di una celletta termostata, e collegato a un computer. Le determinazioni sono state eseguite in cuvette di quarzo, contenenti un agitatore magnetico, alla temperatura di 30°C, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 320 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 400 nm. La miscela di reazione conteneva 0,1 mg/mL di proteine mitocondriali disciolte in un tampone di respirazione (la stessa soluzione utilizzata per la misurazione del consumo di ossigeno) contenente BSA allo 0,1%, PHPA 0,2 mg/mL, HRP 60 U/mL. La reazione di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata innescata dall'aggiunta di piruvato/malato alla concentrazione finale 10 mM e 2,5 mM, rispettivamente; o di succinato 10 mM più rotenone 4 µM. Sono state anche effettuate misure con i due substrati in presenza di ADP 500 µM o di antimicina A 10 µM. I valori delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono stati ricavati usando una curva standard di concentrazioni note di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono state espresse come *pmol/min/mg di proteine mitocondriali*.

### Capacità di rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La capacità di rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*CR*) è stata determinata confrontando la capacità di sospensioni mitocondriali di ridurre l'emissione di fluorescenza, legata alla formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con quella di soluzioni di desferiossammina, un antiossidante a concentrazione nota (Venditti *et al.*, 2001). Per rimozione si intende la trasformazione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, operata sia da enzimi come la Catalasi e la glutatione perossidasi sia da citocromi mitocondriali, che convertono l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in radicale idrossilico. Per riprodurre *in vitro* una condizione simile a quella delle cellule *in vivo*, si utilizza un sistema funzionante come sorgente continua di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Come sorgente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata utilizzata la reazione di ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi (GOX), una flavoproteina altamente specifica per il β-D(+)-glucosio.

Il substrato non fluorescente PHPA è ossidato nel prodotto fluorescente stabile 2,2'-diidrossi-difenil-5,5'-diacetato (Hyslop; Sklar, 1984), tramite la riduzione enzimatica di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizzata dall'HRP. Anche in tal caso la fluorescenza è stata monitorata attraverso un fluorimetro Jasko, all'interno di cuvette di quarzo mantenute a 30°C. La reazione è stata innescata dall'aggiunta di 10 μL GOX 80 μg/mL ad una miscela contenente PHPA 0,2 mg/mL, HRP 6 U/mL, glucosio 5 mM in KCl 145 mM, Hepes 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 0,1 mM, a pH 7,4. Dopo 100 secondi di incubazione, 10 μL di desferiossammina (contenente da 1 a 12 nmol), oppure aliquote di sospensioni mitocondriali (contenenti da 0,1 a 1 mg di proteine mitocondriali) sono state aggiunte al volume finale di 2 mL. I valori della variazione di fluorescenza per unità di tempo ( $\Delta I/\text{min}$ ), ottenuti dopo l'aggiunta di desferiossammina o di mitocondri, sono stati convertiti nella relativa percentuale dei valori ottenuti prima dell'aggiunta.

I valori della desferiossammina sono stati usati per ricavare le curve standard tramite il programma Fig. P (Biosoft, Cambridge, Mass.). I valori ottenuti per le sospensioni mitocondriali sono stati, invece, utilizzati per ricavare le capacità di tali sospensioni di rimuovere l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizzando l'equazione che descrive le curve standard.

La capacità di rimuovere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata espressa come *quantità equivalente di desferiossammina per mg di proteine mitocondriali*.

### *Danno ossidativo ai lipidi*

L'estensione dei processi perossidativi a livello tissutale e mitocondriale è stata determinata misurando il livello degli idroperossidi lipidici (HPs), seguendo spettrofotometricamente il consumo di NADPH in un sistema di reazioni accoppiate.

Questo metodo (Heath e Tappel, 1976) si basa su due reazioni; la prima consiste in una reazione catalizzata dall'enzima Glutazione perossidasi (GPX), in cui il GSH è trasformato in GSSG:



Nella seconda reazione, il GSSG viene riconvertito a GSH dall'enzima Glutazione reduttasi (GR), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a  $\text{NADP}^+$ :



Secondo la procedura, 10  $\mu\text{L}$  dei campioni, sospensioni mitocondriali con una concentrazione di 1 mg/ml in una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM, pH 7,6) ed omogenati diluiti al 10% nella stessa soluzione tampone, sono mescolati con 700  $\mu\text{L}$  dello stesso tampone ed incubati per 5 minuti a temperatura ambiente.

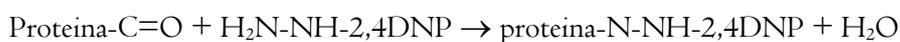
Per innescare la prima reazione sono stati aggiunti in rapida successione:

- 100  $\mu\text{L}$  di GSH 4,25 mM
- 50  $\mu\text{L}$  di NADPH 2 mM
- 10  $\mu\text{L}$  di GPX 2,5 U/ml.

Le soluzioni così preparate sono state incubate a 33°C per 15 minuti. L'aggiunta dell'enzima GR alla concentrazione finale di 2,5 U/mL ha innescato l'ultima tappa del processo, in cui il NADPH è ossidato a  $\text{NADP}^+$ . Per valutare la quantità di NADPH consumato, sono state eseguite due letture dell'assorbanza del campione a 340 nm, al tempo zero e dopo 15 minuti. La differenza, tra l'assorbimento iniziale e finale, divisa per il coefficiente di estinzione molare del NADPH ( $6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), è utilizzata per misurare il contenuto di idroperossidi, espressi come *nmoli di NADPH ossidato/min/per gr di tessuto e pmoli di NADPH ossidato/min/mg di proteine mitocondriali*.

### *Danno ossidativo alle proteine*

Per la valutazione quantitativa del danno ossidativo delle proteine è stato utilizzato il metodo di Reznick e Packer (1994), modificato da Schild *et al.* (1997). Questo metodo utilizza come markers dell'ossidazione proteica i gruppi carbonilici che si formano in seguito alle modificazioni ossidative indotte dai radicali su alcuni amminoacidi delle proteine. Queste reazioni sono catalizzate da cationi metallici come  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  che, legandosi a specifici siti sulle proteine e coadiuvati da  $H_2O_2$  e  $O_2$ , possono trasformare i gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina e istidina in gruppi carbonilici. La quantificazione dei gruppi carbonilici è effettuata con una metodica spettrofotometrica che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine:



Per ogni determinazione sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenenti ciascuna 0,5 mL di omogenato. Tali campioni sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente con un tampone fosfato 50 mM contenente 0,1% di digitonina, 40  $\mu\text{g/mL}$  di fenilmetilsulfonil-metile (PMSF), 5  $\mu\text{g/mL}$  di aprotonina, EDTA 1 mM e centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti; il surnatante prelevato è stato poi incubato con streptomicina 1% a temperatura ambiente per 10 minuti, per far precipitare il DNA, e centrifugato nuovamente a 10000 rpm per 10 minuti. In seguito, in una delle due aliquote sono stati aggiunti 4 mL di HCl 2,5 M (bianco), nell'altra 4 mL di DNPH 10 mM in HCl 2,5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 5 mL di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 4 mL di TCA 10%, tre volte con 4 mL di una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) per eliminare i lipidi, e alla fine sono stati disciolti in 2 mL di idrocloruro di guanidina 6 M. Infine si è determinato l'assorbimento a 355 e 390 nm, che corrispondono alle lunghezze d'onda a cui si hanno i picchi di massimo assorbimento della DNPH.

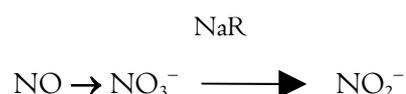
Per i mitocondri sono state utilizzate aliquote contenenti 0,5 mg di proteine mitocondriali. Tali proteine sono state precipitate in acido tricloroacetico (TCA) al 10%, centrifugate, risospese in 300  $\mu\text{L}$  di NaOH 0,1 M e incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. In una delle due aliquote sono stati aggiunti 2 mL di HCl 2,5 M (bianco), nell'altra 2 mL di DNPH 10 mM in HCl 2,5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 1,65 mL di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati

una volta con 1,5 mL di TCA 10%, tre volte con una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e alla fine sono stati disciolti in 1 mL di idrocloruro di guanidina 6 M. Infine si è determinato l'assorbimento a 370 nm, corrispondente alla lunghezza d'onda a cui si ha il massimo di assorbimento della DNPH.

Il contenuto di carbonili è stato calcolato, utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ( $22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) ed è stato espresso come *nmol di carbonili/g di tessuto* e *nmol di carbonili/mg di proteine*.

## Dosaggio dell'ossido nitrico

I livelli di nitriti e nitrati negli estratti mitocondriali sono stati misurati con il reattivo di Griess. In soluzione acquosa l'ossido nitrico è rapidamente convertito in nitrato e nitrito. Il rapporto tra la concentrazione di nitrato e nitrito può variare sostanzialmente in dipendenza del fluido biologico e del mezzo usato. Il reattivo di Griess non misura il nitrato, per tale motivo si usa l'enzima Nitrato reduttasi NADH-dipendente per convertire il nitrato in nitrito prima del dosaggio, in modo da avere un'accurata determinazione dell'ossido nitrico prodotto.



Il dosaggio è stato effettuato utilizzando un kit in commercio per la determinazione del nitrato in campioni biologici.

In sintesi, il dosaggio è stato eseguito usando micropiastre di 96 pozzetti, in ciascun pozzetto sono stati caricati 85  $\mu\text{L}$  di sospensione mitocondriale, ai quali sono stati addizionati 10  $\mu\text{L}$  di enzima Nitrato reduttasi diluita in tampone (MOPS 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) e 10  $\mu\text{L}$  di NADH 2 mM e incubato per 20 min sotto agitazione. Poi si sono aggiunti 50  $\mu\text{L}$  di color reagent I: Sulfanilamide (p-Aminobenzensulfonamide) in HCl 3 N e agitato brevemente per 5 min a temperatura ambiente. In seguito è stato aggiunto il color reagent 2: N-(1-Naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride in acqua distillata e agitato per 5 min a temperatura ambiente.

L'assorbimento è stato misurato alla lunghezza d'onda di 540 nm entro 20 min dall'aggiunta del color reagent 2. Sulla stessa piastra, in alcuni pozzetti sono state caricate quantità note di nitrato. L'assorbimento delle diverse concentrazioni di nitrato ha consentito di ricavare una retta di taratura che è stata utilizzata per ricavare la concentrazione di nitrato nei nostri campioni biologici.

La concentrazione di nitrato è espressa in *pmoli/mg di proteine*.

### Determinazione dei livelli degli antiossidanti

Il contenuto di coenzima Q e di vitamina E è stato valutato mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) a fase inversa. In questo tipo di cromatografia gli eluenti (fase mobile) sono pompati a elevata pressione sulla fase stazionaria rappresentata dal supporto solido contenuto nella colonna metallica. La soluzione del campione è iniettata sulla fase mobile, attraverso una porta di iniezione. Quando il campione fluisce insieme alla fase mobile attraverso la fase stazionaria, la migrazione dei suoi componenti dipende dalle interazioni non covalenti con la fase stazionaria. Le interazioni chimiche tra la fase stazionaria e il campione e tra questi e la fase mobile determinano il grado di migrazione e la separazione degli elementi contenuti nel campione. Nella cromatografia a fase inversa la separazione avviene in base all'idrofilità e alla lipofilità. La resina contenuta nella colonna di acciaio è costituita da sferette di silicio cui sono legate covalentemente catene n-alchiliche. In questo modo, i composti idrofili fluiscono più rapidamente dei composti idrofobici. Questa tecnica è molto vantaggiosa perché consente di realizzare la separazione cromatografica in tempi molto brevi. Per la determinazione del CoQ è stata utilizzata una colonna cromatografica C18 Ultremex 5 delle dimensioni di 250x4,6 mm contenente particelle di silice del diametro di 5 µm. La fase mobile era costituita da una miscela metanolo/etanolo (3/7 v/v), contenente perclorato di sodio 20 mM e la velocità del flusso era fissata a 1 mL/min (Lang *et al.*, 1986).

Per la valutazione del contenuto totale di coenzima Q nei tessuti, gli ubiquinoli (CoQH<sub>2</sub>) sono ossidati a ubiquinoni (CoQs), utilizzando tricloruro ferrico come ossidante. L'ossidazione è stata ottenuta mescolando 0,5 mL di omogenato con 0,5 mL di FeCl<sub>3</sub> al 2% e 2 mL di etanolo. A tale miscela sono stati aggiunti 5 mL di esano, nel quale i composti lipofili hanno una maggiore solubilità, mescolando il tutto accuratamente. Lo strato di esano è stato recuperato e successivamente rimosso per evaporazione mediante un flusso di azoto a 40°C. Il residuo secco è stato risospeso in etanolo e iniettato sulla colonna cromatografica. Mediante uno spettrofotometro UV 100 Spectra Series si è ottenuta una lettura a 275 nm dell'assorbimento del liquido, che fuoriusciva dalla colonna, mentre un integratore, collegato a esso, ha fornito l'area sottostante i picchi di assorbimento. Tali aree, mediante l'ausilio di standard esterni, hanno consentito una determinazione separata del contenuto dei coenzimi Q9 e Q10.

Per la determinazione della vitamina E, gli omogenati tissutali e le sospensioni mitocondriali sono stati deproteinizzati con metanolo ed estratte con n-esano. Gli estratti sono stati evaporati sotto flusso di azoto a 40°C e i residui secchi disciolti in etanolo. Per determinare il contenuto di vitamina E è stata seguita la procedura per HPLC di Lang *et al.*, (1986) e la determinazione quantitativa è stata ottenuta utilizzando uno standard esterno.

Per la valutazione del contenuto di glutatione ridotto (GSH), è stata seguita spettrofotometricamente, alla lunghezza d'onda di 412 nm, la riduzione dell'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) da parte del GSH. Il glutatione ossidato è ridotto dall'enzima Glutatione reduttasi, in presenza di NADPH. In pratica, per la valutazione del GSH le sospensioni mitocondriali sono state diluite (1:1) con HClO<sub>4</sub> 0,5 N, centrifugate a 2000 g per 10 minuti a 4°C (Fernández V., 1991; Ji et Fu, 1992) ed i supernatanti sono stati neutralizzati con NaOH 2M e diluiti 1:7 con fosfato di sodio 0,1 M a pH 7,4. Il campione è stato diviso in due aliquote, una per il dosaggio del glutatione totale, una per la determinazione del GSSG dopo aver mascherato il GSH con 2-vinilpiridina. Per determinare il GSH totale, sono stati prelevati 200 µL dalle diluizioni dei campioni, cui sono stati aggiunti 600 µL di soluzione tampone e 48 µL di TEA (trietanolamina), procedendo alla lettura allo spettrofotometro. Per determinare il GSSG, a 120 µL di campioni, si aggiungono 8 µL di 2-vinilpiridina e 24 µL di TEA, che ha la funzione di prevenire l'auto-ossidazione del GSH. Si incuba per 20-60 minuti a 25°C, in modo da ottenere il completo mascheramento del GSH.

Per il dosaggio, si pongono nelle cuvette 700 µL di NADPH 0,3 mM, 100 µL di DTNB 6 mM e il campione. Alle cuvette, equilibrate a 30°C, si aggiungono 10 µL di GR 50 U/mL e si esegue una lettura continua a 412 nm (Griffith, 1980) fino ad un valore > 2.

La concentrazione di GSH è stata misurata come descritto da Griffith (1980). La velocità di riduzione del DTNB è sostanzialmente lineare e dipende dal solo glutatione totale (Tietze, 1969): la velocità di variazione del colore è proporzionale al contenuto del glutatione totale, che è ricavato da curve costruite con soluzioni standard di GSH e GSSG ed è espressa in *nmoli di DTNB ridotto/mg di proteine mitocondriali*.

### Attività degli enzimi glutatione perossidasi (GPX) e glutatione reduttasi (GR)

La determinazione dell'attività dell'enzima GPX è stata eseguita secondo la procedura di Flohè e Gunzler (1985), utilizzando campioni di omogenato diluiti 1:100 con una soluzione di saccarosio 0,25 M, EDTA 2 mM, Tris 25 mM. Tale procedura è basata sulla catalisi operata dalla Glutatione Perossidasi (GPX) nella reazione:



In questo metodo, il mezzo di reazione, contenente GSH e GR, è costituito da una soluzione di  $KH_2PO_4$  0,1 M, EDTA 1 mM a pH 7,0. Il campione è stato incubato in tale miscela per 5 min a 37 °C. In seguito è stato aggiunto NADPH, lasciandolo in incubazione per altri 5 minuti. In questo modo è stato possibile determinare il consumo di NADPH non legato alla riduzione dell'idroperossido. La reazione è stata innescata dall'aggiunta dell' $H_2O_2$  per la valutazione nel tessuto epatico, mentre per la misurazione nel tessuto cardiaco e muscolare, la reazione è stata innescata dall'aggiunta del terz-butyl-idroperossido (TBH). Il GSSG prodotto è stato riconvertito a GSH in una reazione catalizzata dall'enzima GR che usa come cofattore il NADPH. Il consumo di NADPH è stato determinato misurando la variazione di assorbimento a 340 nm e dividendo tale variazione per il coefficiente di estinzione del NADPH.

L'attività della GPX è espressa in  $\mu\text{moli di NADPH consumato}/\text{min}/\text{g tessuto}$ .

L'attività della GR, invece, è stata determinata in accordo con il protocollo Carlberg e Mannervik (1985). Questo si fonda sulla capacità riducente mostrata dalla GR verso il GSSG, con formazione di GSH a spese del NADPH.



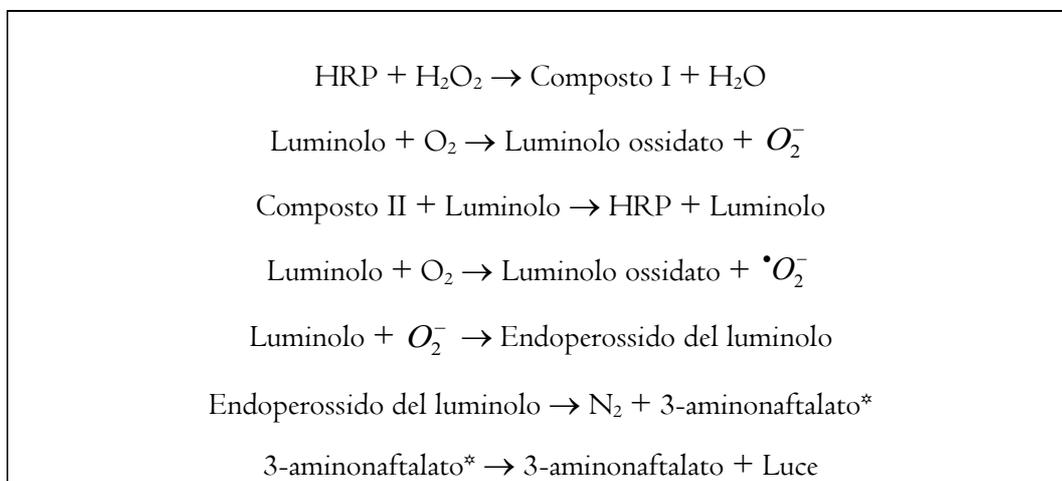
La determinazione è stata eseguita utilizzando 1 ml di un mezzo di reazione contenente il substrato, il GSSG a concentrazione 20 mM e il NADPH a concentrazione 2 mM. Questa miscela è stata incubata a 30 °C per 3 minuti e successivamente sono stati aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di campione di omogenato al 10% (p/v), in modo che la reazione di riduzione del GSSG potesse essere innescata. In modo analogo alla determinazione dell'attività GPX, anche per le reazioni catalizzate dalla GR, il consumo del NADPH è stato determinato spettrofotometricamente.

L'attività della GR è stata espressa come  $\mu\text{moli di NADPH consumato}/\text{min}/\text{g tessuto}$ .

### Suscettibilità allo stress ossidativo

La valutazione della risposta allo stress ossidativo è stata effettuata con una metodica sviluppata nel nostro laboratorio, che prevede l'utilizzo della strumentazione e dei reattivi dell'Amerlite system (Johnson & Johnson, Cinisello Balsamo; Italy). Tale metodica si basa sul principio che l'interazione tra radicali liberi e composti chemiluminescenti, genera un segnale luminoso potenziato con meccanismi a cascata (chemiluminescenza potenziata). Per chemiluminescenza si intende l'emissione di luce dovuta a reazioni esoergoniche, in genere ossidative. Negli ultimi anni sono stati sintetizzati molti composti chemiluminescenti. Tra questi il più conosciuto è il luminolo, un diacilidrazide ciclico che emette luce in seguito ad ossidazione. La reazione tra luminolo e perossido d'idrogeno, mostrata in figura 6 richiede un catalizzatore di natura metallica, come il rame, o di natura enzimatica come una perossidasi. Nel metodo da noi utilizzato per la valutazione della risposta allo stress ossidativo, è stata impiegata la perossidasi di rafano (HRP) come catalizzatore della formazione del radicale idrossilico ( $\cdot\text{OH}$ ). La reazione catalizzata dall'enzima HRP è abbastanza complessa e consiste in una serie di reazioni che comportano la formazione dell'anione 3-aminoftalato nello stato energetico eccitato. Il decadimento di tale stato eccitato si traduce poi in un'emissione luminosa (Llesuy *et al.*, 1990).

## Possibile meccanismo semplificato per la luminescenza potenziata dall'HRP.



**Figura 6:** Luminescenza potenziata

Il dosaggio è stato compiuto in piastre contenenti micropozzetti. La reazione è stata innescata miscelando 25  $\mu\text{L}$  di ciascuna diluizione tessutale con 250  $\mu\text{L}$  di una miscela di reazione (RM), preparata sciogliendo una tavoletta contenente substrato in eccesso (perborato di sodio) e sostanze che generano il segnale luminoso (benzoato di sodio, indofenolo, luminolo) in tampone a pH 8,6 forniti dalla Johnson&Johnson.

Il perborato di sodio agiva da pro-ossidante liberando in soluzione perossido d'idrogeno. Le piastre, incubate a 37°C sotto agitazione per circa 30 secondi, sono state inserite in un analizzatore automatico del segnale luminoso, che ha fornito i valori di emissione come percentuale di uno standard arbitrario, costituito da 25  $\mu\text{L}$  di perossidasi di rafano a concentrazione pari a 22 ng/mL. I valori dell'emissione luminosa ottenuti sono stati impiegati per la costruzione di una curva dose-risposta, usando il programma FIG-P (Biosoft, Cambridge, UK).

### *Analisi statistica*

I risultati ottenuti in otto differenti esperimenti sono stati espressi come valori medi  $\pm$  l'errore standard. I dati sono stati analizzati con il metodo della varianza a una via oppure a due vie quando opportuno. Quando è stato trovato un valore del rapporto F significativo, è stato usato il test di Student-Newman-Keul per determinare la significatività statistica delle differenze tra le medie. I valori sono stati considerati significativamente differenti quando  $P < 0,05$ .

# *RISULTATI*

### Stima dello stato tiroideo

Lo stato tiroideo è stato valutato prendendo in considerazione i seguenti parametri:

- Peso corpo.
- Valore del rapporto peso cuore/peso corpo (HW/BW).
- Livelli plasmatici di FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> (Tabella I).

Come si evince dalla Tabella I, entrambi i gruppi ipertiroidei, HE e HS, presentano pesi corporei significativamente inferiori e rapporti peso cuore/peso corpo significativamente più alti rispetto ai ratti eutiroidei di controllo.

I livelli plasmatici di FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> sono significativamente aumentati dal trattamento T<sub>3</sub>, mentre l'esercizio provoca una diminuzione nei livelli di FT<sub>3</sub> nei ratti ipertiroidei e nei livelli di FT<sub>4</sub> negli animali eutiroidei.

### Tabella I

Indicatori dello stato tiroideo.

<i>Parametri</i>	<i>Gruppi</i>			
	ES	EE	HS	HE
BW	389 ± 13.9	394.4 ± 18.1	341.5 ± 8.0 <sup>a</sup>	342.8 ± 15.9 <sup>a</sup>
HW/BW (mg/g)	2.10 ± 0.04	2.12 ± 0.02	3.46 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.42 ± 0.07 <sup>a</sup>
FT <sub>3</sub> (pg/dl)	222 ± 12	172 ± 15	1693 ± 132 <sup>a</sup>	1082 ± 116 <sup>a,b</sup>
FT <sub>4</sub> (ng/dl)	2.05 ± 0.02	1.80 ± 0.010	0.20 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>a</sup>

I valori sono la media ± SEM di otto diversi esperimenti.

BW = peso corporeo.

HW/BW = peso cuore/peso corporeo.

FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> = livello serico di triiodotironina e tiroxina libera.

<sup>a</sup>Significativo vs i ratti eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup>Significativo vs i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### *Resistenza all'esercizio*

Tutti i ratti eutiroidi hanno terminato le sei ore di esercizio. Al contrario, due degli animali ipertiroidi si sono esauriti dopo circa 290 e 310 minuti, rispettivamente. Inoltre, gli altri ratti ipertiroidi, pur avendo terminato la sessione di nuoto, mostravano chiari segni di affaticamento.

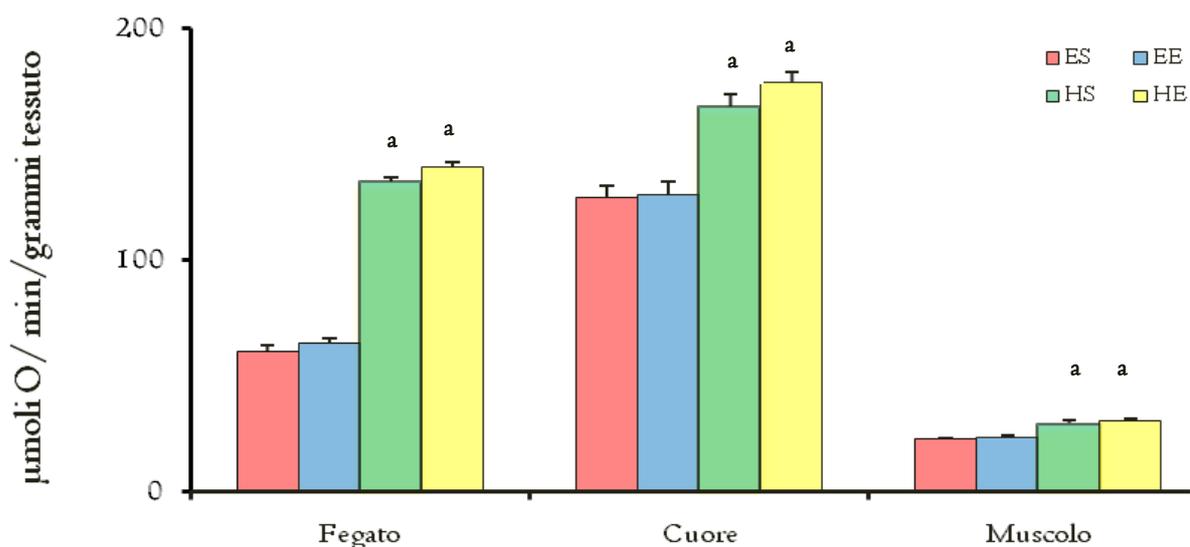
### *Attività dell'enzima citocromo ossidasi*

L'attività della COX negli omogenati di fegato, cuore e muscolo scheletrico è stata aumentata dalla somministrazione di  $T_3$ , ma non è stata modificata dall'esercizio sia negli animali eutiroidi sia in quelli ipertiroidi (*Figura 7*).

Similmente nella frazione mitocondriale del muscolo scheletrico, pesante e leggera, le attività COX sono più alte nei ratti ipertiroidi che nei rispettivi controlli eutiroidi, ma non sono differenti negli animali sedentari ed esercitati. Inoltre, in tutti i gruppi non ci sono differenze tra le attività COX delle frazioni  $M_3$  e  $M_8$  (*Tabella 2*).

Il rapporto tra le attività COX dell'omogenato di muscolo e della popolazione mitocondriale fornisce una valutazione approssimativa del contenuto tessutale delle proteine mitocondriali, il quale non è modificato dall'esercizio o dal trattamento  $T_3$  (*Figura 8a*).

In tutti i gruppi, il contenuto percentuale di proteine mitocondriali è più bassa nella frazione  $M_8$  che nella frazione  $M_3$ . I due diversi trattamenti non inducono una significativa modificazione del contenuto percentuale delle proteine contenute nelle due frazioni (*Figura 8b*).



**Figura 7:** Effetto dello stato ipertiroidico sull'attività dell'enzima (COX) in omogenati tissutali di ratti sedentari ed esercitati.

I valori sono la media  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti.

<sup>a</sup> significativo vs i rispettivi controlli eutiroidici.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Tabella 2

Effetti dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sull'attività della COX in preparati di muscolo scheletrico.

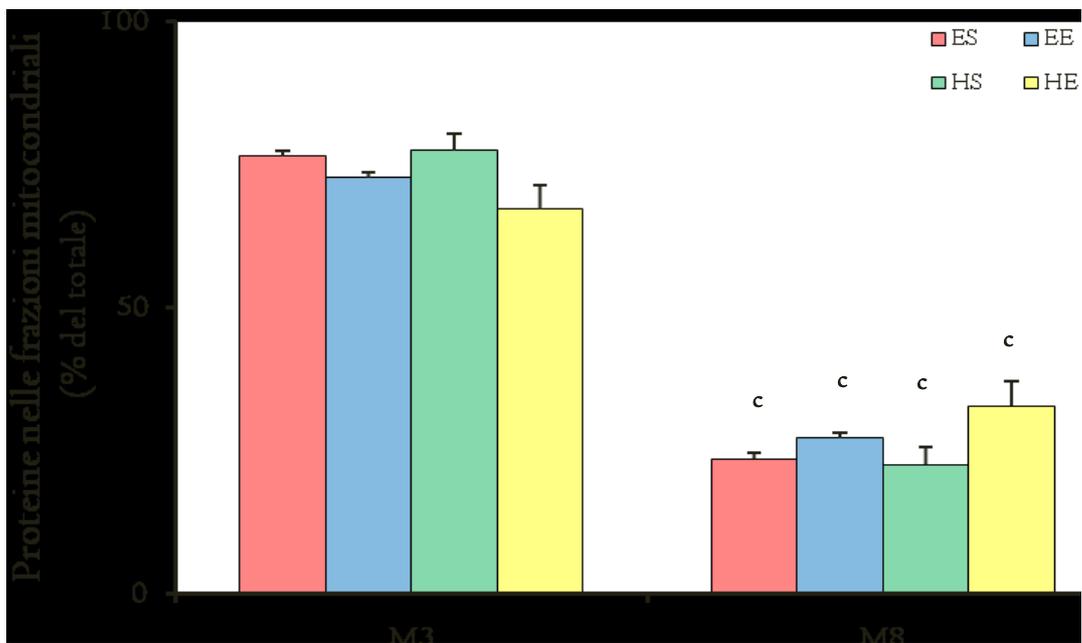
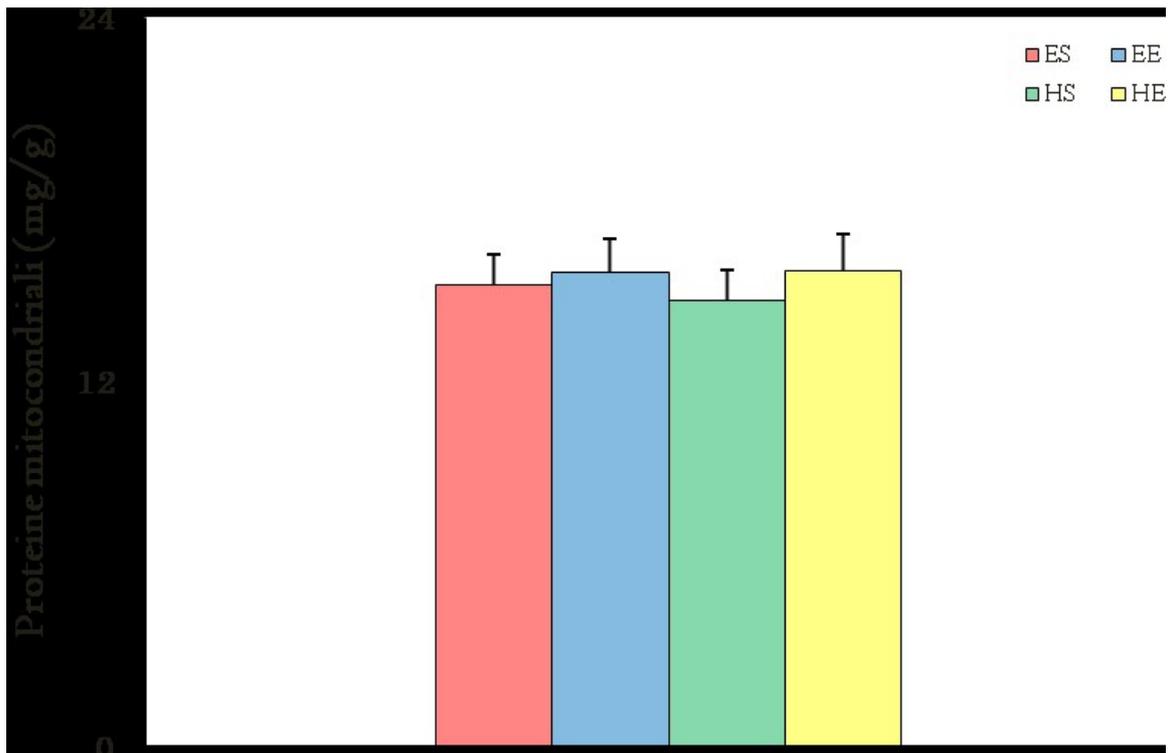
Gruppi	Citocromo Ossidasi			Proteine Mitocondriali
	Omogenati	M <sub>3</sub>	M <sub>3</sub>	
ES	21.9 $\pm$ 0.7	1.47 $\pm$ 0.03	1.41 $\pm$ 0.02	15.2 $\pm$ 1.1
EE	21.5 $\pm$ 1.2	1.39 $\pm$ 0.08	1.37 $\pm$ 0.07	15.6 $\pm$ 1.2
HS	29.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	2.03 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	14.7 $\pm$ 1.0
HE	30.6 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	15.7 $\pm$ 1.2

I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM di otto esperimenti.

L'attività della COX è espressa come  $\mu\text{molO}/\text{min}/\text{g}$  di tessuto e  $\mu\text{molO}/\text{min}/\text{mg}$  di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs rispettivi ratti eutiroidici di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.



**Figura 8:** Effetto dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sul contenuto di proteine mitocondriali di muscolo (a) e distribuzione delle proteine nelle frazioni mitocondriali (b).

<sup>c</sup> indica valori significativi tra le frazioni M<sub>3</sub> e M<sub>8</sub>.

### Consumo di ossigeno

Le velocità del consumo di  $O_2$  in presenza di succinato come substrato della respirazione sono riportate in Tabella 3.

Negli omogenati di fegato e di cuore, tali velocità sono più alte nei ratti ipertiroidi rispetto agli eutiroidi di controllo e non significativamente differenti nei ratti sedentari ed esercitati durante la F4 e F3. Al contrario, nei preparati di muscolo scheletrico le velocità sono più alte nei ratti ipertiroidi esercitati che in quelli eutiroidi e sedentari di controllo durante la F4, mentre esse sono più alte nei ratti ipertiroidi che nei rispettivi eutiroidi di controllo e più basse negli esercitati che negli ipertiroidi sedentari durante la F3.

Le velocità del consumo di  $O_2$  in presenza di piruvato/malato come substrato della respirazione sono riportate in Tabella 4.

Negli omogenati di fegato tali velocità durante la F4 e la F3 sono più alte negli ipertiroidi che nei controlli eutiroidi, e sono più basse negli esercitati che nei ratti ipertiroidi sedentari. Negli omogenati di cuore le velocità durante le due fasi sono più alte negli ipertiroidi che nei controlli eutiroidi e sono simili nei ratti esercitati e nei loro controlli sedentari. Negli omogenati di muscolo durante la F4 le velocità di consumo sono più alte nei ratti ipertiroidi rispetto ai controlli eutiroidi e più basse negli ipertiroidi esercitati rispetto ai ratti ipertiroidi sedentari. Le velocità durante la F3 sono più alte negli ipertiroidi sedentari che nei controlli eutiroidi e più basse negli ipertiroidi esercitati rispetto ai ratti ipertiroidi sedentari.

Le velocità del consumo di  $O_2$  sostenute dai substrati respiratori, succinato e piruvato/malato, da parte dei mitocondri di muscolo sono riportate in Tabella 5.

In presenza di succinato, le velocità di consumo di  $O_2$  nello stato 4 sono più alte nei ratti ipertiroidi esercitati rispetto agli eutiroidi sedentari. Al contrario, durante la F3, le velocità sono incrementate dal trattamento  $T_3$  negli animali sedentari mentre hanno subito diminuzioni di diversa entità in seguito all'esercizio nei ratti eutiroidi ed ipertiroidi, così che i valori ritrovati nei mitocondri isolati dagli animali appartenenti a questi due gruppi non sono significativamente differenti. A causa degli effetti opposti dell'esercizio sui valori di F4 e F3 della respirazione, l'RCR è più basso negli animali eutiroidi ed ipertiroidi esercitati che in quelli sedentari di controllo. Utilizzando piruvato/malato come substrato respiratorio, le velocità di respirazione durante lo stato 4 sono più alte nei ratti ipertiroidi che nei controlli eutiroidi e sono più basse nei ratti ipertiroidi esercitati che negli ipertiroidi sedentari. Durante la F3, le velocità sono più alte nei ratti ipertiroidi sedentari che in quelli eutiroidi di controllo e sono più basse negli animali ipertiroidi esercitati che

in quelli sedentari. Anche con i substrati legati al complesso I, il valore dell'RCR è più basso negli animali ipertiroidei esercitati che in quelli eutiroidei e sedentari di controllo.

**Tabella 3**

Effetto dello stato ipertiroideo sulle velocità di consumo di O<sub>2</sub> in presenza di succinato da parte degli omogenati di ratti sedentari ed esercitati.

Tessuti	Parametri	Gruppi			
		ES	EE	HS	HE
Fegato	Stato 4	2.13 ± 0.09	2.39 ± 0.10	4.16 ± 0.16 <sup>a</sup>	4.55 ± 0.17 <sup>a</sup>
	Stato 3	9.76 ± 0.18	10.02 ± 0.32	20.14 ± 1.04 <sup>a</sup>	20.19 ± 0.32 <sup>a</sup>
	RCR	4.92 ± 0.27	4.84 ± 0.28	5.21 ± 0.28	5.16 ± 0.34
Cuore	Stato 4	3.55 ± 0.20	3.69 ± 0.15	4.88 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.86 ± 0.11 <sup>a</sup>
	Stato 3	10.69 ± 0.80	11.02 ± 0.30	17.52 ± 1.12 <sup>a</sup>	17.86 ± 0.06 <sup>a</sup>
	RCR	2.67 ± 0.16	2.97 ± 0.10	3.01 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.12 ± 0.20 <sup>a</sup>
Muscolo	Stato 4	1.15 ± 0.07	1.27 ± 0.05	1.29 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.10 <sup>ab</sup>
	Stato 3	3.49 ± 0.09	2.98 ± 0.11	5.86 ± 0.25 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.13 <sup>ab</sup>
	RCR	2.84 ± 0.12	2.60 ± 0.13	3.58 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.14 <sup>b</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

Le velocità di consumo di ossigeno sono espresse come µmol O/min/g di tessuto.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Tabella 4

Effetto dello stato ipertiroideo sulle velocità di consumo di O<sub>2</sub> in presenza di piruvato/malato da parte degli omogenati di ratti sedentari ed esercitati.

Tessuti	Parametri	Gruppi			
		ES	EE	HS	HE
Fegato	Stato 4	0.56 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.95 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
	Stato 3	1.58 ± 0.08	1.64 ± 0.08	3.80 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.51 ± 0.13 <sup>a,b</sup>
	RCR	2.82 ± 0.16	2.72 ± 0.10	3.78 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.06 <sup>b</sup>
Cuore	Stato 4	0.93 ± 0.03	0.97 ± 0.06	1.27 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.04 <sup>a</sup>
	Stato 3	4.80 ± 0.21	4.56 ± 0.13	7.04 ± 0.17 <sup>a</sup>	7.23 ± 0.18 <sup>a</sup>
	RCR	4.98 ± 0.28	4.43 ± 0.37	5.10 ± 0.41	5.51 ± 0.48
Muscolo	Stato 4	0.49 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.64 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.04 <sup>a,b</sup>
	Stato 3	2.52 ± 0.06	2.11 ± 0.15	2.80 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.09 <sup>b</sup>
	RCR	4.81 ± 0.26	4.05 ± 0.22	4.58 ± 0.27	3.33 ± 0.18 <sup>a,b</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

Le velocità di consumo di ossigeno sono espresse come µmol O<sub>2</sub>/min/g di tessuto.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Tabella 5

Effetto dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sulle velocità di consumo di O<sub>2</sub> da parte dei mitocondri di muscolo di ratto.

<i>Substrato</i>		<i>Gruppo</i>			
		<b>ES</b>	<b>EE</b>	<b>HS</b>	<b>HE</b>
<b>Succinato</b>	Stato 4	81.3 ± 3.1	90.1 ± 4.2	93.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	106.4 ± 4.0 <sup>a,b</sup>
	Stato 3	316.0 ± 8.8	252.3 ± 10.1 <sup>b</sup>	391.0 ± 7.6 <sup>a</sup>	294.1 ± 12.0 <sup>b</sup>
	RCR	3.8 ± 0.3	3.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.1	2.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
<b>Pir/Mal</b>	Stato 4	29.0 ± 1.4	30.3 ± 1.8	40.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	52.6 ± 1.6 <sup>a,b</sup>
	Stato 3	209.9 ± 5.3	204.7 ± 5.6	258.0 ± 6.6 <sup>a</sup>	210.9 ± 8.5 <sup>b</sup>
	RCR	6.4 ± 0.2	5.9 ± 0.3	6.0 ± 0.4	3.8 ± 0.2 <sup>a,b</sup>

I valori sono la media ± SEM di otto diversi esperimenti.

Le velocità del consumo di ossigeno sono espresse in nmol O / min / mg di proteine

<sup>a</sup>Significativo vs i ratti di eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup>Significativo vs i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Velocità di rilascio dell' $H_2O_2$

Le velocità di rilascio dell' $H_2O_2$  dai mitocondri di muscolo sono riportati in Tabella 6. Durante sia la respirazione basale che stimolata da ADP ed in presenza dei substrati legati al complesso I o al complesso II, esse sono state incrementate dal trattamento  $T_3$  e dall'esercizio. In seguito all'aggiunta di antimicina A, le velocità di rilascio mitocondriale di  $H_2O_2$ , che rimangono più alte nei ratti ipertiroidi rispetto agli eutiroidi, non erano significativamente differenti negli animali sedentari ed esercitati.

### Tabella 6

Effetti dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sul rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza di succinato e piruvato malato nei mitocondri del muscolo scheletrico di ratto.

<i>Substrati e aggiunte</i>	<i>Gruppi</i>			
	ES	EE	HS	HE
Succinato	115.2 ± 1.9	130.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	158.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	184.0 ± 3.2 <sup>ab</sup>
Succinato + ADP	65.7 ± 3.5	73.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	75.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	104.4 ± 2.0 <sup>ab</sup>
Succinato + AA	847.2 ± 10.2	835.7 ± 5.3	938.0 ± 19.8 <sup>a</sup>	917.0 ± 8.0 <sup>a</sup>
Piruvato/Malato	185.7 ± 1.4	205.8 ± 7.3 <sup>b</sup>	224.0 ± 13.6 <sup>a</sup>	320.3 ± 3.0 <sup>ab</sup>
Piruvato/Malato+ADP	78.8 ± 2.7	92.3 ± 3.2 <sup>b</sup>	87.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	125.4 ± 1.1 <sup>ab</sup>
Piruvato/Malato+AA	948.1 ± 10.0	933.5 ± 12.5	1042.5 ± 18.9 <sup>a</sup>	1026.0 ± 6.1 <sup>a</sup>

I valori sono la media ± SEM di otto diversi esperimenti.

Le velocità del rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono espresse in pmol O / min / mg di proteine

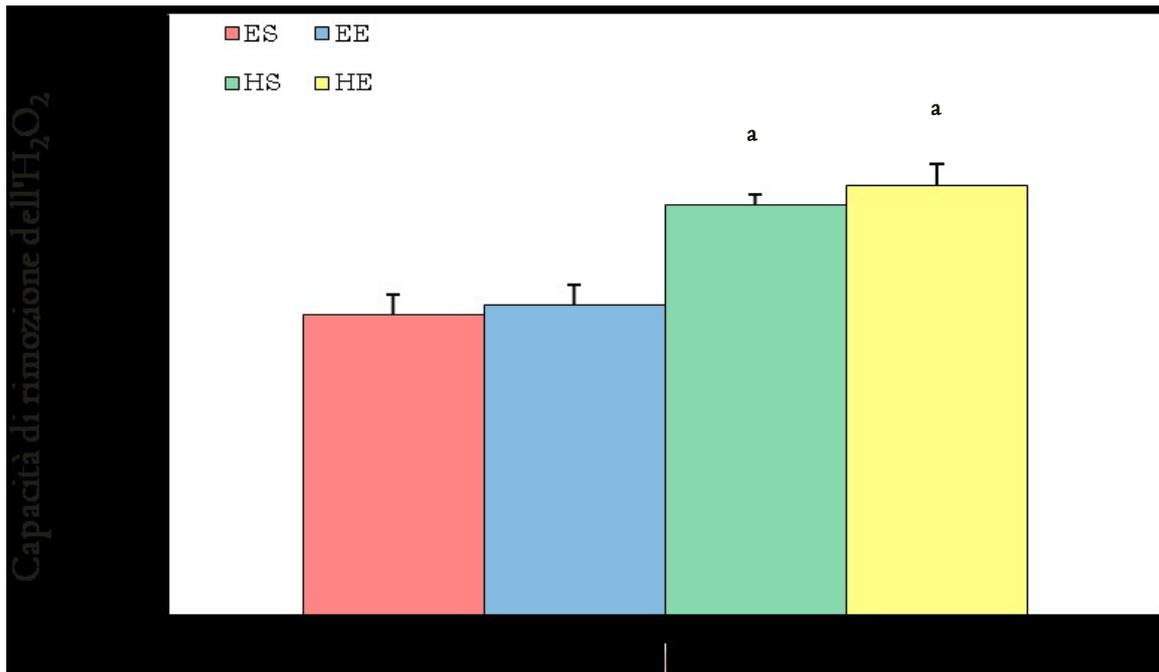
<sup>a</sup>Significativo vs i ratti di eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup>Significativo vs i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Capacità di rimozione di $H_2O_2$

Le capacità dei mitocondri di muscolo di rimuovere  $H_2O_2$ , espresse come concentrazione equivalente di desferossamina (nmol/mg proteine) non sono state modificate dall'esercizio sia nei ratti eutiroidei sia ipertiroidei. Al contrario, esse sono state incrementate dal trattamento con  $T_3$  sia negli animali sedentari sia negli esercitati (Figura 9).



**Figura 9:** Effetto dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sulla capacità dei mitocondri di rimuovere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La capacità di rimuovere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è espressa come equivalenti di concentrazione di desferossamina (nmol/mg proteine).

I valori sono la media  $\pm$  SEM di otto diversi esperimenti.

<sup>a</sup> significativo verso i rispettivi controlli eutiroidi.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### *Danno ossidativo tessutale e mitocondriale*

Gli effetti dell'esercizio e il trattamento T<sub>3</sub> sugli indici di danno ossidativo tessutale sono riportati in Tabella 7.

Nei preparati tessutali ipertiroidei i livelli di Hps lipidici e CO proteici sono significativamente più alti rispetto ai controlli eutiroidei. Inoltre, tali livelli sono aumentati dall'esercizio sia negli animali eutiroidei sia negli ipertiroidei. Comunque, dall'analisi delle variazioni percentuali si evince che il danno ossidativo è significativamente più ingente nei preparati ipertiroidei (Figura 10).

Per quanto riguarda la frazione mitocondriale pesante di muscolo scheletrico, i livelli sia degli idroperossidi sia dei carbonili proteici sono significativamente incrementati dalla somministrazione di T<sub>3</sub> e dall'esercizio acuto; i più alti valori sono stati raggiunti quando i ratti ipertiroidei sono stati sottoposti all'esercizio (Tabella 8). Risultati simili sono stati ottenuti per i livelli di idroperossidi nelle frazioni mitocondriali leggere, pari a  $12.7 \pm 0.1$ ;  $14.8 \pm 0.1$ ;  $16.0 \pm 0.2$ ; e  $18.4 \pm 0.4$  per i gruppi ES, EE, HS, e HE, rispettivamente.

I livelli mitocondriali di nitriti e nitrati sono più alti nei ratti ipertiroidei che nei rispettivi controlli eutiroidei. Inoltre, i livelli sono più alti negli animali esercitati che in quelli sedentari, così che essi raggiungono il più alto valore negli animali ipertiroidei esercitati.

**Tabella 7**

Effetto dello stato ipertiroidico sul danno ossidativo nei tessuti di ratti sedentari ed esercitati.

Tessuto	Parametri	Gruppi			
		ES	EE	HS	HE
Fegato	Hps	1.42±0.08	1.70±0.02 <sup>b</sup>	1.97±0.07 <sup>a</sup>	2.50±0.07 <sup>a,b</sup>
	CO	2.74±0.08	3.18±0.12 <sup>b</sup>	4.02±0.09 <sup>a</sup>	4.80±0.15 <sup>a,b</sup>
Cuore	Hps	0.37±0.01	0.44±0.02 <sup>b</sup>	0.50±0.03 <sup>a</sup>	0.65±0.01 <sup>a,b</sup>
	CO	1.52±0.07	1.99±0.05 <sup>b</sup>	2.68±0.10 <sup>a</sup>	3.60±0.06 <sup>a,b</sup>
Muscolo	Hps	0.21±0.01	0.31±0.02 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	0.49±0.01 <sup>a,b</sup>
	CO	2.22±0.06	3.05±0.08 <sup>b</sup>	3.54±0.08 <sup>a</sup>	4.61±0.08 <sup>a,b</sup>

**Tabella 8**

Effetti dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sul danno ossidativo e nitrosativo nella frazione mitocondriale pesante di muscolo di ratto.

Parametri	Gruppi			
	ES	EE	HS	HE
Idroperossidi	13.8 ± 0.5	17.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	18.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	24.4 ± 1.1 <sup>a,b</sup>
Carbonili	2.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
Nitriti e Nitrati	56.3 ± 4.1	77.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	93.46± 9.9 <sup>a</sup>	134.0± 4.0 <sup>a,b</sup>

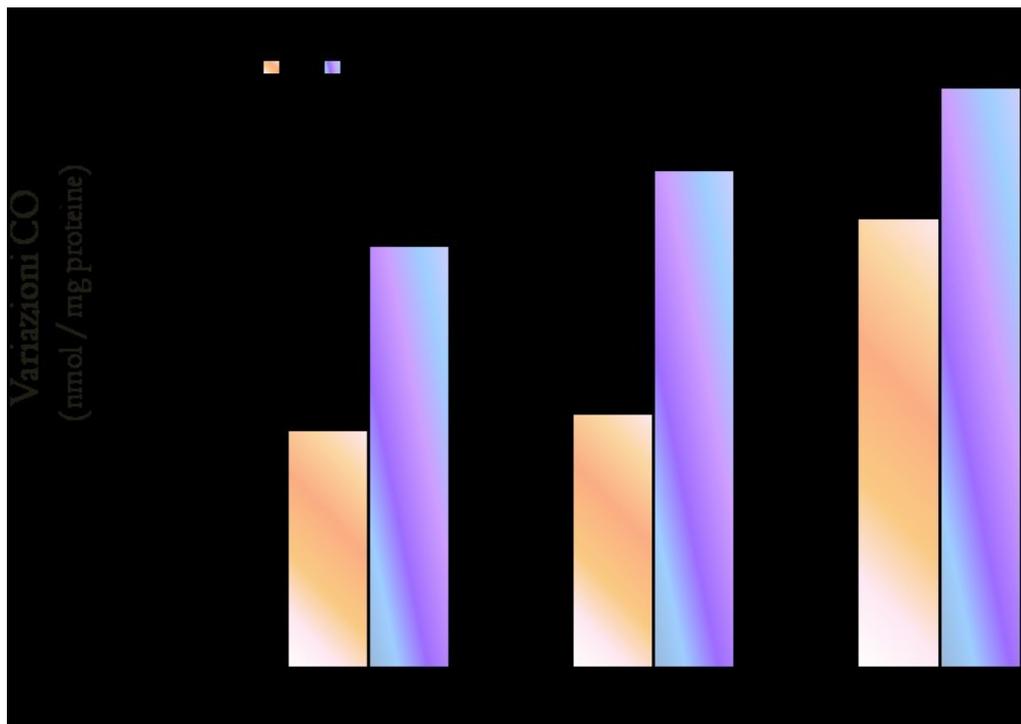
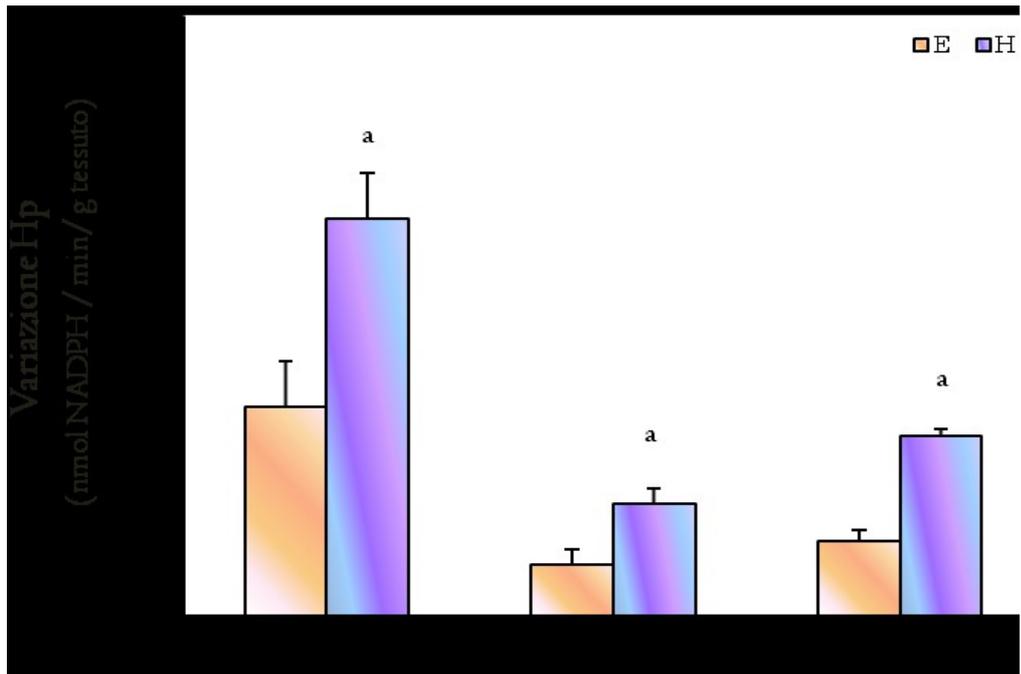
I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti. Gli idroperossidi sono espressi come nmol NADPH/min/g tessuto. I gruppi carbonili sono espressi come nmol/mg di proteine.

I nitrati e i nitriti sono espressi come pmol/mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> significativo vs ratti eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> significativo vs i ratti i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.



**Figura 10:** Variazioni nei livelli di idroperossidi (Hps) e carbonili proteici (CO) indotte dall'esercizio nei tessuti di ratti eutiroidi ed ipertiroidi.

<sup>a</sup> significativo verso ratti eutiroidi.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

## Antiossidanti

I risultati riguardanti le determinazioni delle attività enzimatiche GPX e GR, e dei livelli degli antiossidanti a basso peso molecolare sono riportati in Tabella 9.

Il trattamento T<sub>3</sub> ha aumentato le attività enzimatiche GPX e GR nel fegato e nel cuore dei ratti sedentari, e le attività della GR nel cuore dei ratti esercitati. D'altro canto, l'esercizio ha incrementato le attività GPX e GR nei cuori dei ratti trattati con T<sub>3</sub>, mentre ha incrementato l'attività GR nel fegato e nel cuore dei ratti eutiroidei. Entrambi i trattamenti non hanno modificato le attività degli enzimi antiossidanti nel muscolo scheletrico.

Nel fegato, il trattamento T<sub>3</sub> ha incrementato i livelli di vitamina E nei ratti sedentari, e i livelli di CoQ9 e CoQ10 nei ratti sedentari ed esercitati. L'esercizio ha aumentato i livelli di CoQ9 e CoQ10 nei ratti eutiroidei ed ha diminuito i livelli di vitamina E e di CoQ9 nei ratti ipertiroidei. Nel cuore, il trattamento T<sub>3</sub> ha ridotto i livelli di vitamina E aumentando, invece, i livelli di CoQ9 nei ratti sedentari, mentre ha incrementato i livelli di vitamina E e diminuito i livelli di CoQ10 nei ratti esercitati. L'esercizio ha aumentato i livelli di tutti gli scavengers nei ratti eutiroidei e quelli della vitamina E e CoQ9 nei ratti ipertiroidei. Nel muscolo, il trattamento T<sub>3</sub> ha aumentato i livelli di vitamina E e diminuito quelli del CoQ9 nei ratti sedentari, mentre ha incrementato i livelli di vitamina E e CoQ9 e ridotto quelli del CoQ10 nei ratti ipertiroidei. L'esercizio ha incrementato i livelli del CoQ9 e CoQ10 negli eutiroidei e i livelli della vitamina E e del CoQ9 negli animali ipertiroidei.

Come mostrato in Tabella 10, i livelli mitocondriali di GSH sono diminuiti dall'esercizio nei ratti ipertiroidei ma non in quelli eutiroidei, mentre sono diminuiti dal trattamento T<sub>3</sub> negli animali sedentari ed esercitati. I livelli di vitamina E sono diminuiti dal trattamento T<sub>3</sub> nei ratti sedentari ed incrementati dall'esercizio nei ratti trattati con T<sub>3</sub>.

**Tabella 9**

Effetti dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sui livelli degli antiossidanti nei tessuti di ratti sedentari ed esercitati.

Tessuto	Parametri	Gruppi			
		ES	EE	HS	HE
Fegato	GPX	78.36±1.28	84.67±2.21	87.80±5.48 <sup>a</sup>	93.94±4.13
	GR	11.49±0.40	12.64±0.28 <sup>b</sup>	13.51±0.39 <sup>a</sup>	12.46±0.05
	Vit E	43.60±1.83	39.31±1.19	51.21±1.94 <sup>a</sup>	39.19±2.03 <sup>b</sup>
	CoQ9	47.13±0.48	51.57±0.75 <sup>b</sup>	65.81±0.61 <sup>a</sup>	61.15±1.81 <sup>ab</sup>
	CoQ10	4.10±0.15	5.53±0.46 <sup>b</sup>	8.02±0.75 <sup>a</sup>	8.71±0.707 <sup>a</sup>
Cuore	GPX	15.97±0.24	15.15±0.48	13.52±0.80 <sup>a</sup>	15.60±0.13 <sup>b</sup>
	GR	0.88±0.07	1.21±0.08 <sup>b</sup>	1.42±0.08 <sup>a</sup>	1.73±0.05 <sup>ab</sup>
	Vit E	37.61±1.12	46.41±0.83 <sup>b</sup>	33.50±1.20 <sup>a</sup>	51.96±0.63 <sup>ab</sup>
	CoQ9	111.24±0.42	159.90±0.73 <sup>b</sup>	146.07±0.77 <sup>a</sup>	161.47±0.86 <sup>ab</sup>
	CoQ10	10.40±0.33	13.64±1.09 <sup>b</sup>	11.54±0.16	11.46±0.06 <sup>a</sup>
Muscolo	GPX	4.11 ± 0.13	4.31 ± 0.12	4.35 ± 0.06	4.56 ± 0.17
	GR	0.71 ± 0.05	0.66 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.63 ± 0.01
	Vit E	14.19 ± 0.45	12.97 ± 0.33	19.34 ± 0.21 <sup>a</sup>	23.01 ± 0.74 <sup>ab</sup>
	CoQ9	50.25 ± 0.30	57.66 ± 0.42 <sup>b</sup>	44.61 ± 0.50 <sup>a</sup>	54.56 ± 0.81 <sup>ab</sup>
	CoQ10	2.17 ± 0.03	3.49 ± 0.21 <sup>b</sup>	2.51 ± 0.06	2.39 ± 0.70 <sup>a</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

Le attività GPX sono GR espresse in µmol NADPH/min/g tessuto.

Il contenuto di Vit E, CoQ9 e CoQ10 è espresso in nmol/g tessuto.

<sup>a</sup> significativo vs ratti eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> significativo vs i ratti i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

### Tabella 10

Effetti dell'esercizio e dell'ipertiroidismo sulle concentrazioni di vitamina E e di glutazione nella frazione mitocondriale pesante del muscolo scheletrico.

<i>Parametri</i>	<i>Gruppi</i>			
	ES	EE	HS	HE
Vitamina E	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.1	0.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>
GSH	5.32 ± 0.03	5.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.89 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.48 ± 0.12 <sup>a,b</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

Il contenuto di vitamina E e di glutazione è espresso come nmol /mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> significativo vs ratti eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> significativo vs i ratti i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

## Risposta allo stress ossidativo

La risposta luminescente ai cambiamenti della concentrazione degli omogenati (Figura I1) sono descritti dall'equazione:

$$E = aC / \exp(bC)$$

In questa equazione  $a$  dipende dalla concentrazione delle sostanze, come i citocromi, capaci di reagire con  $H_2O_2$  per produrre i radicali  $\cdot OH$  inducendo la reazione luminescente; e  $b$  dipende dalla concentrazione delle sostanze in grado di prevenire la formazione o l'interazione con i radicali  $\cdot OH$  riducendo, quindi, i livelli di emissione luminosa. Tali livelli sono aumentati dal trattamento  $T_3$  sia nei ratti sedentari sia negli esercitati e dall'esercizio in tutti i tessuti dei ratti ipertiroidei, e solo nel muscolo degli animali eutiroidei (Figura I2).

Poiché il livello dell'emissione luminosa, e in particolare l'emissione massima ( $E_{max} = a/eb$ ), può essere considerata un indice della suscettibilità dei preparati alla minaccia ossidativa (Reznick, 1994), le suddette differenze nei livelli di emissione suggeriscono che la suscettibilità agli ossidanti è aumentata dal trattamento  $T_3$  in tutti i tessuti e dall'esercizio nel fegato e nel cuore di animali sottoposti al trattamento ormonale e nel muscolo indipendentemente dallo stato tiroideo.

Queste valutazioni qualitative sono confermate dai valori di  $E_{max}$  riportati in Tabella II. L'esame dei parametri che caratterizzano l'emissione luminosa mostrano che i più alti valori del picco di emissione trovati in seguito al trattamento ormonale sono da attribuire ai più alti valori di  $a$  per i preparati di cuore e di muscolo. Al contrario, gli effetti dell'esercizio sono esclusivamente da attribuire all'abbassamento dei valori di  $b$ . In generale, le differenze del parametro  $a$  tra i preparati dei tessuti sembrano essere correlata alle differenze nelle attività della COX. Al contrario, non è mostrata una simile correlazione tra i valori di  $b$  e i livelli dei vari antiossidanti.

## Tabella II

Effetto dell'ipertiroidismo sui parametri che caratterizzano la risposta allo stress ossidativo dei tessuti di ratti sedentari ed esercitati.

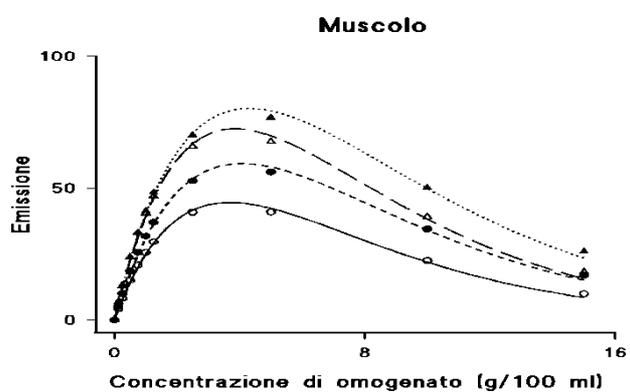
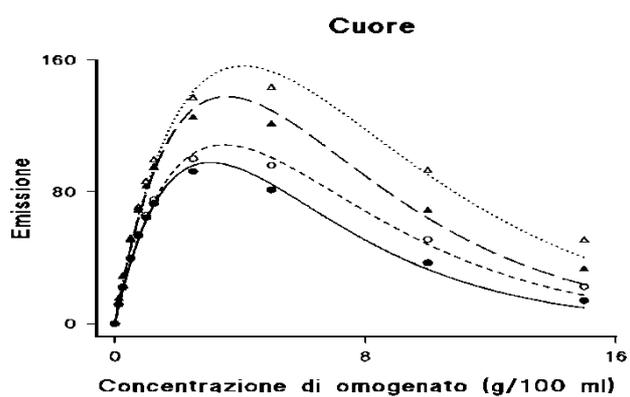
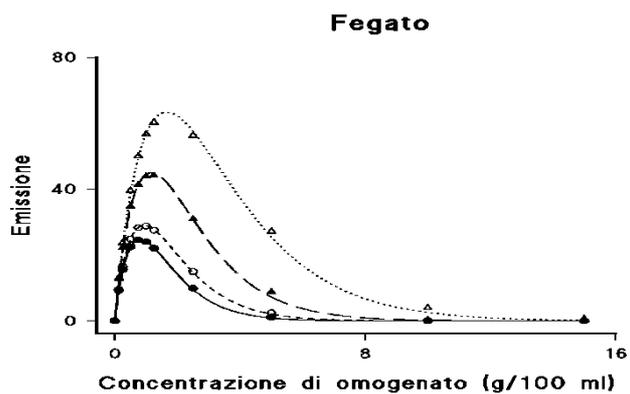
Tessuto	Parametri	Gruppi			
		ES	EE	HS	HE
Fegato	a	82.68±3.07	83.24±1.82	104.66±4.52 <sup>a</sup>	102.76±4.18 <sup>a</sup>
	b	1.24±0.05	1.07±0.09	0.87±0.03 <sup>a</sup>	0.59±0.08 <sup>ab</sup>
	E <sub>max</sub>	24.51±1.60	28.60±1.61	44.23±2.00 <sup>a</sup>	64.03±2.72 <sup>ab</sup>
Cuore	a	98.14±2.37	97.83±3.06	126.51±6.05 <sup>a</sup>	132.77±8.52 <sup>a</sup>
	b	0.39±0.02	0.36±0.01	0.36±0.02	0.32±0.01
	E <sub>max</sub>	92.52±5.43	99.91±4.89	129.20±7.20 <sup>a</sup>	152.53±7.54 <sup>ab</sup>
Muscolo	a	31.62±2.52	35.06±3.14	47.68±3.2 <sup>a</sup>	45.92±4.44 <sup>a</sup>
	b	0.28±0.01	0.23±0.02 <sup>b</sup>	0.26±0.01	0.21±0.01 <sup>b</sup>
	E <sub>max</sub>	41.52±2.40	56.04±2.91 <sup>b</sup>	67.42±3.24 <sup>a</sup>	80.39±3.33 <sup>ab</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

<sup>a</sup> significativo vs ratti eutiroidei di controllo.

<sup>b</sup> significativo vs i ratti i ratti sedentari di controllo.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.



**Figura II:** Effetto dell'ipertiroidismo sulla risposta in vitro all'insulto ossidativo di omogenati tissutali da ratti sedentari e esercitati.

- ratti sedentari
- ratti esercitati
- - - ratti ipertiroidi sedentari
- ..... ratti ipertiroidi esercitati

# ***DISCUSSIONE***

Un primo interessante risultato di questo lavoro riguarda gli effetti dell'esercizio acuto, della somministrazione di  $T_3$ , e di entrambi i trattamenti sui livelli degli indici di danno ossidativo alle molecole biologiche negli omogenati dei tessuti di ratto. Studi precedenti avevano mostrato un incremento della perossidazione lipidica nei tessuti di ratto, come il muscolo scheletrico, il cuore e il fegato, in seguito alla somministrazione di  $T_3$  (Videla *et al.*, 2000) o dell'esercizio prolungato (Alessio *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 1992; Di Meo et Venditti *et al.*, 1996). Viceversa, è stato riportato che l'ossidazione proteica aumentava nel cuore (Bejma *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2003) e in vari muscoli scheletrici (Perez *et al.*, 2003), mentre restava invariato nel fegato, nel cuore e nei muscoli scheletrici dei ratti sottoposti alla corsa (Bejma *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). Finora un solo lavoro ha fornito una prova evidente dell'ossidazione proteica nei ratti ipertiroidi (Tapia *et al.*, 1999). I risultati del presente lavoro, in accordo con studi precedenti, indicano che sia il nuoto eseguito acutamente sia la somministrazione di  $T_3$  producono un incremento della perossidazione lipidica nei tessuti di ratti. Inoltre, essi mostrano che tali trattamenti producono un aumento nei livelli dei markers dell'ossidazione proteica e lipidica in tutti i tessuti esaminati. È stato anche evidenziato che nei ratti sottoposti a esercizio acuto e resi sperimentalmente ipertiroidi l'aumento dei markers di danno ossidativo è ancora più notevolmente. Poiché esistono prove di un legame tra danno ossidativo e fatica del muscolo scheletrico (Venditti *et al.*, 1996), questi risultati, ottenuti dai due trattamenti combinati (Di Meo et Venditti, 1996), spiegano facilmente anche la ridotta capacità di sostenere l'esercizio acuto da parte dei ratti ipertiroidi. Inoltre, sono in accordo con il fatto che i tessuti prelevati da animali ipertiroidi esibiscono una più elevata suscettibilità all'insulto ossidativo. Tale suscettibilità è stata valutata mediante una tecnica di chemiluminescenza potenziata in cui l'estensione dei cambiamenti ossidativi, risultanti dall'esposizione *in vitro* degli omogenati di tessuto all' $H_2O_2$ , è stata determinata dai livelli dell'emissione luminosa da una reazione luminescente indotta da un ossidante.

I risultati ottenuti dalle molteplici analisi indicano che la suscettibilità degli omogenati dei tessuti alla sfida ossidativa non solo aumenta negli animali trattati con  $T_3$ , ma subisce un incremento rilevante in seguito all'esercizio in tutti i tessuti ipertiroidi e nei muscoli scheletrici eutiroidei. Come già accennato nella sezione dei risultati, l'aumento della suscettibilità tissutale all' $H_2O_2$  indotta dalla  $T_3$  è essenzialmente dovuto ad un aumento del parametro *a*, ad eccezione del fegato ove l'aumentata suscettibilità è causata da una diminuzione del parametro *b*. Viceversa, nei ratti esercitati l'incremento della suscettibilità tissutale è ascrivibile ad una diminuzione del parametro *b*. L'aumento del parametro *a* legato allo stato tiroideo è sostanzialmente in accordo con gli effetti esercitati dalla  $T_3$  sul contenuto tissutale dei citocromi mitocondriali (Brand *et al.*, 1987), mentre i

cambiamenti nel parametro  $b$  legati all'esercizio potrebbero riflettere, invece, una ridotta efficienza del sistema di difesa antiossidante.

In effetti, sono state compiute numerose misure relative ad alcuni componenti del sistema di difesa antiossidante al fine di valutarne l'efficienza in seguito ai due trattamenti. In particolare abbiamo valutato le attività degli enzimi glutatione perossidasi (GPX) e glutatione reduttasi (GR), due enzimi cruciali del sistema di difesa antiossidante, e il contenuto di scavengers a basso peso molecolare presenti nelle membrane cellulari, quali vitamina E e coenzima Q. L'azione combinata di GPX e GR è il principale determinante del contenuto tissutale del glutatione ridotto (GSH), poiché l'enzima GR è capace di rigenerare la forma ridotta del glutatione in seguito alla sua ossidazione ad opera dell'enzima GPX. La vitamina E è il più importante antiossidante liposolubile capace di prevenire sia la perossidazione lipidica iniziata dal radicale libero sia il danno tissutale (Tappel *et al.*, 1972). Il coenzima Q (ubichinone) è un componente delle membrane cellulari di tutti i mammiferi ove svolge una funzione antiossidante, che può essere attribuita o ad un sinergismo con la vitamina E (Kagan *et al.*, 1990) o ad una diretta attività di scavenger (Ernster *et al.*, 1992). È evidente che l'esercizio e il trattamento  $T_3$  inducono cambiamenti tessuto-dipendente non bilanciati e spesso opposti nelle attività degli enzimi e nei livelli degli antiossidanti liposolubili che, nel complesso, sono scarsamente correlati al danno ossidativo tissutale. Comunque, è interessante notare che in seguito all'esercizio i livelli di scavengers generalmente diminuiscono nel fegato e aumentano nel cuore e nel muscolo scheletrico. I risultati che riguardano i livelli di coenzima Q negli omogenati dei tessuti eutiroidei sono in parte in accordo con quelli riportati da Liu *et al.* (2000) secondo i quali, dopo l'esercizio prolungato, l'ubichinolo totale era diminuito nel fegato e aumentato nel cuore, mentre la vitamina E era aumentata nel cuore, ma mostrava livelli invariati nel tessuto epatico. Queste osservazioni sembrerebbero indicare l'esistenza di uno "shuttle" di scavengers dal fegato ai tessuti che ne hanno bisogno, l'idea che ciò si verifichi per un antiossidante idrosolubile, come il glutatione ridotto, deriva dall'osservazione che, in seguito ad un esercizio esaustivo, i livelli di GSH erano più bassi nel fegato e nel muscolo scheletrico, mentre risultavano più alti nel plasma, mentre i livelli di GSSG erano più alti nei tre tessuti (Lew *et al.*, 1985).

D'altra parte, i nostri risultati indicano che anche se il suddetto meccanismo protettivo fosse operativo, potrebbe non essere sufficiente a prevenire il danno ossidativo indotto dall'esercizio. È possibile che questo succeda perché cambiamenti in altri componenti del sistema di difesa antiossidante sono tali da determinare una sostanziale riduzione dell'efficacia globale del sistema antiossidante. Una simile riduzione rafforzerebbe l'effetto dell'aumentata attività del radicale libero, che risulta in un aumento del danno ossidativo lipidico e proteico.

Per chiarire i meccanismi della disfunzione tissutale legata al danno ossidativo, abbiamo studiato gli effetti del trattamento ormonale e dell'esercizio acuto sulla popolazione mitocondriale del muscolo scheletrico. Un bersaglio intracellulare primario per lo stress ossidativo, che può spiegare la riduzione della respirazione indotta dall'esercizio nei tessuti ipertiroidei, è rappresentato dai mitocondri, i quali utilizzano più del 90% dell'ossigeno consumato dalle cellule e rappresentano quantitativamente la fonte più importante delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella maggior parte delle cellule aerobiche (Turrens, 2003). All'interno dei mitocondri la riduzione univalente dell'O<sub>2</sub> produce piccole quantità di radicale superossido ( $\cdot O_2^-$ ) convertito in perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dall'enzima superossido dismutasi (SOD) (Loschen *et al.*, 1974). In presenza di O<sub>2</sub> costante, la velocità con cui il superossido è prodotto dipende dalla concentrazione e dal grado di riduzione dei carriers elettronici autossidabili (Chance *et al.*, 1979).

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> può permeare le membrane mitocondriali ed entrare nel citoplasma, all'interno del quale può essere detossificato dagli enzimi metabolizzanti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o può essere rimosso dalle emoproteine le quali formano una specie ferrilica che, in seguito, si decompone rilasciando radicali  $\cdot OH$  (Halliwell *et al.*, 1990). Quindi la catena respiratoria produce più H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di quanto ne viene rilasciato dai mitocondri ed informazioni sulla velocità di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possono essere ottenute dalla determinazione delle velocità di rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dalla capacità di rimozione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Venditti *et al.*, 2001). L'osservazione che sia il rilascio sia la rimozione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono più alti nei mitocondri ipertiroidei indica che l'ormone tiroideo accelera la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il che conferma quanto osservato su ratti di 60 giorni (Venditti *et al.*, 2003). I nostri risultati mostrano anche che la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è aumentata dall'esercizio sia nei preparati di ratti eutiroidei sia in quelli ipertiroidei, restando più alta negli ipertiroidei. Sebbene sia il trattamento con T<sub>3</sub> che l'esercizio conducano a un aumento della produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le velocità del rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trovate in presenza di Antimicina A suggeriscono che i meccanismi alla base di tali aumenti sono differenti.

Le velocità di produzione di ROS dipendono dalla concentrazione e dal grado di riduzione dei carriers elettronici autossidabili (Turrens *et al.*, 2003). L'antimicina A interrompe il trasferimento degli elettroni a livello dell'ubichinone-citocromo b localizzato nel complesso III (Turrens *et al.*, 1985) in modo che i carriers elettronici situati fra il lato del substrato e il citocromo b-560 diventano completamente ridotti; quindi, la più alta velocità di produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimolata dall'antimicina A nei preparati ipertiroidei suggerisce che il trattamento con T<sub>3</sub> induce un aumento del contenuto dei carriers elettronici autossidabili. Viceversa, l'assenza di cambiamenti nelle velocità

osservata nei mitocondri degli animali esercitati esclude che un simile aumento sia indotto anche dall'esercizio.

Le ROS prodotte dai mitocondri possono interagire e danneggiare numerosi componenti cellulari (Esterbauer *et al.*, 1991), ma i radicali ossidrilici, che sono specie altamente reattive e di breve vita, potrebbero danneggiare i componenti mitocondriali localizzati nel sito, o vicino al sito della loro formazione; quindi, i mitocondri sono un bersaglio probabile di danno ossidativo indotto dall'esercizio e dal trattamento con T<sub>3</sub>.

I cambiamenti negli indici di danno ossidativo, come i livelli di idroperossidi lipidici e di gruppi carbonilici proteici, sono in accordo con l'osservazione che sia il trattamento con T<sub>3</sub> sia l'esercizio aumentano la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'altro canto, la mancata riduzione dei livelli di GSH nei preparati eutiroidei non è sorprendente, poiché il GSH mitocondriale può essere conservato a spese di quello citosolico grazie al sistema di trasporto stimolato dall'ATP situato nella membrana interna (Martensson *et al.*, 1990) e non è ridotto da un esercizio di lunga durata (Venditti *et al.*, 1999). Al contrario, non ci si aspettava che nei ratti trattati con T<sub>3</sub> tale sistema non fosse capace di impedire la diminuzione del GSH mitocondriale poiché il GSH citosolico è utilizzato per detossificare una quantità maggiore di ROS. Anche i livelli di Vitamina E sono aumentati dall'esercizio negli animali ipertiroidei, tale dato non è sorprendente poiché in precedenza è stato dimostrato che, in seguito all'esercizio, i livelli di CoQ9 e di vitamina E diminuiscono nel fegato ed aumentano nel muscolo dei ratti ipertiroidei, suggerendo che il fegato pompa gli antiossidanti liposolubili nel plasma nel tentativo di rifornire i tessuti che ne hanno bisogno (Venditti *et al.*, 2005).

È interessante che, oltre all'aumento del danno ossidativo, sia stato trovato un aumento degli indicatori di danno nitrosativo nei preparati mitocondriali dopo l'esercizio o trattamento con T<sub>3</sub>. Questi risultati sono coerenti con l'osservazione che l'ormone tiroideo aumenta la produzione dell'ossido nitrico nei tessuti bersagli (Fernández *et al.*, 1997; Venditti *et al.*, 2004) e che l'ossido nitrico è generato nel muscolo scheletrico in risposta all'esercizio (Roberts *et al.*, 1999; Reid, 1996).

Sia il danno ossidativo che nitrosativo possono essere coinvolti nel declino della funzione mitocondriale e nel danno cellulare. I nostri risultati mostrano anche che l'incremento indotto dall'esercizio negli indici di danno ossidativo nei muscoli scheletrici è associato a un indebolimento della respirazione mitocondriale che sembra essere indipendente dall'attività dell'enzima citocromo ossidasi. In accordo con studi precedenti che avevano evidenziato un aumento incremento dell'attività della COX nei tessuti di ratti trattati con l'ormone tiroideo (Di Meo *et al.*, 2003), anche nel presente lavoro si è trovato un aumento dell'attività enzimatica negli omogenati dei tessuti di ratti

resi sperimentalmente ipertiroidi. Viceversa, l'attività dell'enzima COX non sembra subire alcuna modificazione in seguito all'esercizio prolungato. I risultati riportati nella presente tesi di dottorato mostrano che, in seguito all'esercizio, la respirazione dei mitocondri di muscolo di ratti ipertiroidi aumenta durante lo stato 4 e diminuisce durante lo stato 3 con i substrati legati sia al complesso I sia al complesso II della catena di trasporto mitocondriale. Viceversa, nei mitocondri dei muscoli eutiroidi, la respirazione mitocondriale è ridotta solo durante lo stato 3 della respirazione sostenuta dal succinato, e in misura minore rispetto a ciò che accade nei preparati ipertiroidi. Poiché l'esercizio modifica la respirazione del tessuto muscolare in modo simile (Venditti *et al.*, 2005), senza influenzare il contenuto di proteine mitocondriali, è chiaro che il danno alla respirazione mitocondriale è responsabile dei cambiamenti del consumo di O<sub>2</sub> nell'intero tessuto.

La scoperta che la capacità metabolica mitocondriale, misurata dall'attività della COX (Simon *et al.*, 1971), è significativamente influenzata dall'ormone tiroideo ma non dall'esercizio indica che l'esercizio riduce lo stato 3 della respirazione mitocondriale senza modificare la loro capacità metabolica. Quindi, è probabile che i cambiamenti indotti dall'esercizio nelle velocità respiratorie coinvolgano modificazioni ossidative di componenti della catena respiratoria mitocondriale differenti dalla citocromo ossidasi. Viceversa, le modificazioni ossidative dei lipidi e delle proteine localizzate nella membrana mitocondriale interna potrebbero essere responsabili dell'incremento della respirazione mostrato in stato 4.

In altre parole, è evidente che a basse velocità di consumo di ossigeno nelle preparazioni ipertiroidi, generalmente più alte dei preparati eutiroidi, durante la respirazione basale e stimolata da ADP sono influenzate dall'esercizio. Quest'osservazione supporta l'idea che l'ipertiroidismo renda i tessuti più suscettibili all'insulto ossidativo, perché evidentemente alla base dei meccanismi sottostanti i cambiamenti opposti riscontrati durante la F4 e la F3 della respirazione, sebbene essi possano essere differenti, sarebbero coinvolte modificazioni ossidative degli elementi della catena respiratoria mitocondriale, diversi dal citocromo aa<sub>3</sub>.

Gli incrementi nello stato 4 della respirazione rappresentano una risposta compensatoria all'aumentato leak protonico nella matrice mitocondriale. Sebbene sia noto che la membrana mitocondriale interna è parzialmente permeabile ai protoni (Nicholls, 1997), i meccanismi molecolari del leak protonico sono ancora materia di dibattito. Comunque, è notevolmente accettato che ci sono due importanti pathways di leak protonico: una conduttanza protonica basale della membrana mitocondriale e una conduttanza protonica inducibile mediata da specifiche proteine leak (Stuart *et al.*, 2000). È stato dimostrato che l'adenosina monofosfato può agire direttamente sul carrier dell'adenina nucleotide (ANT) e provocare una perdita di H<sup>+</sup>, il che può essere impedito

utilizzando uno specifico inibitore dell'ANT (*carbosiatractilattoside*) (Cadenas *et al.*, 2000). Inoltre, è bene accertato che la conduttanza protonica inducibile è catalizzata nel tessuto adiposo bruno da una proteina disaccoppiante (UCPI) (Nicholls *et al.*, 1982). Viceversa, se gli omologhi dell'UCPI identificate in altri tessuti sono responsabili della conduttanza protonica mitocondriale è ancora incerto (Ricquier *et al.*, 2000).

L'osservazione che l'ormone tiroideo incrementa il contenuto di ANT nei mitocondri di fegato e di cuore (Dummler *et al.*, 1996) e regola positivamente l'espressione genica di UCP2 ed UCP3 nel muscolo cardiaco ed in quello scheletrico (Lanni *et al.*, 2001) potrebbe spiegare gli incrementi del consumo di O<sub>2</sub> nella F4 della respirazione nei tessuti ipertiroidei. D'altro canto, però, l'espressione di ANT nel muscolo scheletrico non è influenzata né dal trattamento T<sub>3</sub> (Lombardi *et al.*, 2002) né dall'esercizio acuto (Fernström *et al.*, 2004), per tale motivo si esclude che esso sia responsabile dell'incremento dello stato 4 della respirazione indotto dalla T<sub>3</sub> e dall'esercizio. Comunque, è possibile un'altra spiegazione, che coinvolge la produzione di radicali liberi. Alcune prove sperimentali indicano che l'ormone tiroideo incrementa sia la produzione mitocondriale di ROS (Fernández *et al.*, 1993; Venditti *et al.*, 2003), sia la produzione dell'ossido nitrico (NO<sup>•</sup>) (Fernández *et al.*, 1997; Huffman *et al.*, 2000; Venditti *et al.*, 2004) nei tessuti bersaglio. Inoltre, è stato dimostrato che il radicale superossido (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Talboy *et al.*, 2004) sia il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Brookes *et al.*, 1998), il prodotto della reazione tra <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sup>•</sup>, causano incrementi nella perdita mitocondriale di H<sup>+</sup>, il cui meccanismo sembra coinvolgere la perossidazione lipidica (Brookes *et al.*, 1998; Echtay *et al.*, 2003). Alla luce di ciò, è concepibile che l'incremento del danno ossidativo lipidico indotto dall'esercizio produca un incremento nello stato 4 della respirazione potenziando il leak protonico mitocondriale. Invece, è evidente che la diminuzione indotta dall'esercizio nello stato 3 della respirazione è dovuta ad un'azione diretta delle ROS e/o dalle RNS. L'osservazione che le ROS sono capaci di danneggiare i componenti della catena respiratoria mitocondriale (Zhang *et al.*, 1990) sostiene l'idea che esse possono essere responsabili della riduzione della respirazione mitocondriale in fase 3. In altre parole, è stata anche riportata l'inibizione della funzione mitocondriale da parte sia dell'NO<sup>•</sup> (Borutaite *et al.*, 1996) sia del perossinitrito (Radi *et al.*, 1994), che coinvolge tali sostanze nella funzione mitocondriale alterata.

Alcuni dati che indicano che l'NO<sup>•</sup> è generato nel muscolo scheletrico (Reid *et al.*, 1996) ed in quello cardiaco (Perez *et al.*, 2003) in risposta all'esercizio. Inoltre, un'evidenza indiretta (Ho *et al.*, 2001) e diretta (Qian *et al.*, 2001) è disponibile per l'incrementata produzione di NO<sup>•</sup> indotta dall'esercizio nel fegato. D'altro canto, avendo valutato le velocità respiratorie su preparati isolati, è da escludere la possibilità che la riduzione del consumo di ossigeno esibita dal gruppo HE sia dovuta

all'inibizione NO-dipendente della COX, che è in gran parte competitiva con l'ossigeno (Cassina *et al.*, 1996). Viceversa, il declino delle capacità respiratorie è da attribuire al perossinitrito che, prodotto in notevoli quantità durante l'esercizio acuto, è in grado di causare una lenta e irreversibile inibizione di molti componenti della catena di trasporto mitocondriale differenti dal citocromo aa<sub>3</sub> (Cassina *et al.*, 1996). Questa idea è anche in accordo con la nostra osservazione che l'attività COX non è indebolita dall'esercizio. Inoltre, l'aumento del grado di riduzione dei componenti della catena respiratoria nel sito del substrato associato a tale inibizione, potrebbe spiegare l'aumentata produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trovata nei ratti ipertiroidi esercitati in assenza di cambiamenti nel contenuto dei carriers elettronici autossidabili.

L'inibizione della funzione mitocondriale potrebbe essere dovuta a un incremento del contenuto mitocondriale di Ca<sup>2+</sup>, che si verifica nel muscolo scheletrico in seguito all'esercizio prolungato (Madsen *et al.*, 1996) e che determina un'inibizione della fosforilazione ossidativa (Gunter *et al.*, 1990). Gli effetti deleteri del Ca<sup>2+</sup> sulla funzione mitocondriale potrebbero essere dovute all'induzione del poro di transizione di permeabilità (MPT) (Bernardi *et al.*, 1992), che causa la degradazione della frazione mitocondriale più pesante caratterizzata da una maggiore capacità respiratoria e da una maggiore suscettibilità allo swelling indotto dal Ca<sup>2+</sup> (Venditti *et al.*, 2002). Il trasferimento dei mitocondri danneggiati nella frazione leggera si verifica nei cuori ipertiroidi dopo l'ischemia – riperfusione, come dimostrato dall'incremento del contenuto proteico percentuale e dall'attività COX nella frazione mitocondriale leggera e la loro diminuzione in quella pesante (Venditti *et al.*, 2004). Non abbiamo trovato un trasferimento simile nei mitocondri di muscolo scheletrico dalla frazione pesante a quella leggera dopo l'esercizio acuto, in accordo con l'osservazione che l'esercizio acuto aumenta la resistenza mitocondriale all'eccesso di Ca<sup>2+</sup> nel muscolo scheletrico umano (Fernström *et al.*, 2004). La tolleranza al Ca<sup>2+</sup> in seguito all'esercizio potrebbe essere dovuta al mantenimento dei livelli relativamente alti di GSH, che prevenirebbe il collasso del potenziale di membrana mitocondriale (Vesce *et al.*, 2005), evento che precede l'apertura del poro MPT. Sebbene questo possa sembrare un meccanismo protettivo, esso rallenta la rimozione della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta in eccesso, potenziando in tal modo il danno ossidativo e la disfunzione del muscolo indotti dall'esercizio in particolare negli animali ipertiroidi.

In conclusione, i risultati riportati nel presente lavoro indicano che la concomitanza dell'ipertiroidismo e dell'esercizio acuto, responsabili dell'insorgenza di una condizione di stress ossidativo, favorirebbe l'insorgenza della disfunzione e del danno tessutale. In particolare, l'elevata produzione di radicali liberi in seguito all'esercizio e la maggiore suscettibilità agli ossidanti dei tessuti ipertiroidi produce un più alto indebolimento della respirazione mitocondriale che favorisce,

a sua volta, l'azione dannosa dell'NO<sup>\*</sup>, in particolare in un tessuto, come il muscolo scheletrico, caratterizzato da una ridotta efficacia del sistema di difesa antiossidante.

# ***BIBLIOGRAFIA***

- Abe T. et al., (2002) *Thyroid hormone transporters: recent advances*. Trends Endocrinol. Metab. **13**: 215-220.
- Alessio H.M., Goldfarb A.H. (1988) *Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training*. J. Appl. Physiol. **64**: 1333-1336.
- Bangsbo J.; Johansen L.; Quistorff B.; Saltin B. (1993) *NMR and analytic biochemical evaluation of CrP and nucleotides in the human calf during muscle contraction*. J. Appl. Physiol. **74**: 2034-2039.
- Barja de Quiroga G. (1992) *Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? Free Radical Biol. Med.* **13**: 325-340.
- Barrè H.; Bailly L.; Rouanet J.L. (1987) *Increased oxidative capacity in skeletal muscles from acclimated ducklings: a comparison with rats*. Comp. Biochem. Biophys. B. **88**: 519-522.
- Bejma J.; Ji L.L. (1999) *Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle*. J Appl. Physiol. **87**: 465-470.
- Bernardi P.; Vassanelli S.; Veronese P.; Colonna R.; Szabo I.; Zoratti M. (1992) *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations*. J. Biol. Chem. **267**: 2934-2939.
- Borutaite V.; Brown G.C. (1996) *Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide*. Biochem. J. **315**: 295-299.
- Boveris A.; Oschino N.; and Chance B. (1972) *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem. J. **128**:617-630.
- Boveris A.; Chance B. (1973) *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem. J. **134**: 707-716.
- Brand M.D.; Murphy M.P. (1987) *Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells*. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. **62** (2): 141-193.
- Brookes P.S.; Land J.M.; Clark J.B; Heales S.J. (1998) *Peroxynitrite and brain mitochondria. Evidence for increased proton leak*. J. Neurochem. **70**: 2195-2202.
- Brooks G.A.; Hittelman K.J.; Faulkner J.A.; Beyer R.E. (1971) *Temperature, liver mitochondrial respiratory functions, and oxygen debt*. Med. Sci. Sports **3**: 72-74.
- Byrd S.K.; Bode A.K.; Klug G.A. (1989) *Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function*. J. Appl. Physiol. **66**: 1383-1389.
- Cadenas E.; Boveris A. (1980) *Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria*. Biochem. J. **188**: 31-37.
- Cadenas S.; Buckingham J.A; St-Pierre J.; K.; Dickinson K.; Jones R.B.; Brand M.D. (2000) *AMP decreases the efficiency of skeletal-muscle mitochondria*. Biochem. J. **351**: 307-311.
- Carlberg I.; Mannervik B. (1985) *Glutathione reductase*. Methods Enzymol. **113**, 484-490.
- Cassina A; Radi R. (1996) *Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport*. Arch. Biochem. Biophys. **328**: 309-316.
- Chance B.; Sies H.; Boveris A. (1979) *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev **59**: 527-605.
- Cheng S. Y.; Gong Q. Y.; Perkinson C.; Robinson E. A.; Appella E.; Merlino G. T. et al. (1987) *The nucleotide sequence of human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum*. J Biol. Chem. **262**: 11221-11227.
- Choudhury S.; Chainy G.B.; Mishro M.M. (2003) *Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis*. Andrologia. **35**(3):131-40.
- Davies K.J.A.; Quintanilla A.T.; Brooks G.A.; Packer L. (1982) *Free radicals and tissue damage produced by exercise*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **107**: 1198-1205.
- Davis P.J.; Spanlding S.W.; Gragerman R.I. (1970) *The three thyroxine-binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors*. Endocrinology **87**:978.

- De Martino Rosaroll P.; Venditti P.; Di Meo S.; De Leo T. (1996) *Effect of cold exposure on electrophysiological properties of rat heart*. *Experientia* **52**: 577-582.
- Di Meo S.; Venditti P. (2001) *Mitochondria in exercise-induced oxidative stress*. *Biol. Signals Recept.* **10**:125-140.
- Dummler K.; Muller S.; Seitz H.J. (1996) *Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues*. *Biochem. J.* **317**: 913-918.
- Echtay K.S.; Esteves T.C.; Pakay J.L.; Jakobsons M.B.; Lambert A.J.; Portero-Otin M.; Pamplona M.; Vidal-Puig A.J.; Wang S.; Roebuck S.J.; Brand M.D. (2003) *A Signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling*. *EMBO J.* **22**: 4103-4110.
- Ernster L.; Forsmark P.; Nordenbrand K. (1992) *The action of lipid-soluble antioxidant in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamina E as inhibitor of lipid peroxidation in submitochondrial particles*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **548**: 41-46.
- Esterbauer H.; Schaur R.J.; Zollner H. (1991) *Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 81-128.
- Fernández V.; Videla L.A. (1991) *Thyroid hormone, active oxygen, and lipid peroxidation*. In: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine* pp 105-115, Eds. J. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, Boca Raton FL, CRC Press Inc.
- Fernández V.; Videla L.A. (1993) *Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles*. *Free Radic. Res. Commun.* **18 (6)**: 329-335.
- Fernández V.; Cornejo P.; Tapia G.; Videla L.A. (1997) *Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat*. *Nitric Oxide* **6**: 463-468.
- [Fernström M.](#); [Tonkonogi M.](#); [Sahlin K.](#) (2004) *Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle*. *J Physiol.* **554**: 755-63.
- Flohè L.; Gunzler W.A. (1985) *Assays of glutathione peroxidase*. *Methods Enzymol.* **105**: 114-121.
- Frieseman E.C.; Visser T.J. (2003) *Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter*. *J. Biol. Chem.* **278**: 40128-40135.
- Gornall A.G.; Bardawill C.J.; David M.M. (1949) *Determination of serum proteins by mean of the biuret reaction*. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- Greenspan F.S. (1994) *The thyroid gland*. *Basic and Clinical Endocrinology*, pp. 160-223, Greenspan F. S. and Baxter J. D. (eds), Appleton and Lange, Norwalk.
- Griffith H.R. *et al.*, (1980) *Free radic. Chem. Pathol. & Med.* 439-454.
- [Gunter T.E.](#); [Pfeiffer D.R.](#) (1990) *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. *Am J Physiol.* **258**: C755-C786.
- Gutteridge J.M.C. (1995) *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. *Clin. Chem.* Vol. 41, No 12: 1819-1828.
- Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1990) *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
- Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1998) *Free radicals in biology and medicine* 3<sup>rd</sup>. ed. Oxford University press, Oxford.
- Heath R.L.; Tappel A.L. (1976) *A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides*. *Anal. Biochem.* **76**: 184-191.
- Hennemann G.; Docter R. (1990) *The Thyroid Gland*. Raven.
- Hennemann G. (2001) *Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability*. *Endocrinol. Metab.* **13**:215-220.

- Hyslop P.A.; Sklar L.A. (1984) *A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes.* Anal. Biochem. **141**: 280-286.
- Ho K.P.; Xiao D.S.; Ke Y.; Qian Z.M. (2001) *Exercise decreases cytosolic aconitase activity in the liver, spleen, and bone marrow in rats.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **282** (1): 264-267.
- Horrum M.A.; Tobin R.B.; Ecklund E. (1985) *Thyroxine-induced changes in rat liver mitochondrial cytochromes.* Mol. Cell. Endocrinol. **41**:163-169.
- Horrum M.A.; Tobin R.B.; Ecklund E. (1986) *Thyroxine-induced changes in rat liver mitochondrial ubiquinone.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **138**:381-386.
- Huffman L.J.; Judy D.J.; Rao K.M.; Frazer D.G.; Goldsmith W.T. (2000) *Lung responses to hypothyroidism, hyperthyroidism, and lipopolysaccharide challenge in rats.* J. Toxicol. Environ. Health A. **61** (7): 623-639.
- Ignarro L.J. (2000) *Nitric oxide: biology and pathobiology.* Academic. Press. San Diego.
- Ji L.L.; Fu R. (1992) *Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide.* J Appl Physiol. **72**(2): 549-54.
- Kagan V. E.; Sebrinova E. A.; Packer L (1990) *Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **169**: 851-857.
- Kehrer J.P. (1993) *Free radicals as mediators of tissue injury and disease.* Crit. Rev. Toxicol. **23**: 21-48.
- King D.W.; Gollnick P.D. (1970) *Ultrastructure of rat heart and liver after exhaustive exercise.* Am J. Physiol. **218**: 1150-1155.
- Kowaltowsky A.J.; Vercesi A.E. (1999) *Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.* Free Radical. Biol. Med. **26**: 463-471.
- Kumar C.T.; Reddy V.K.; Prasad M.; Thyagaraju K.; Reddanna P. (1992) *Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress.* Mol Cell Biochem. **111**(1-2): 109-115.
- Lang J.K.; Gohil K.; Packer L. (1986) *Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions.* Anal. Biochem. **157**: 106-116.
- Lanni A. *et al.*; (1996) *Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces.* Int. J. Biochem. Cell. Biol. **28**: 337-343.
- Lanni A.; Beneduce L.; Moreno M.; Lombardi A.; Silvestri E.; Goglia F. (2001) *Uncoupling protein-3 is a molecular determinant for the regulation of resting metabolic rate by thyroid hormone.* Endocrinology. **142**(8): 3414-3420.
- Llesuy S.F.; Milei J.; Gonzalez Flecha B.S.; Boveris. (1990) *A Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology.* Free Radic Biol Med. **8**(3): 259-64.
- Lew H.; Pyke S.; Quintanilha A. (1985) *Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats.* FEBS Lett. **185** (2): 262-266.
- Liu J.; Yeo H.C.; Overvik-Douki E.; Hagen T.; Doniger S.J.; Chyu D.W.; Brooks G.A.; Ames B.N. (2000) *Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants.* J. Appl Physiol. **89** (1): 21-28.
- [Lombardi A.; Silvestri E.; Moreno M.; De Lange P.; Farina P.; Goglia F.; Lanni A.](#) (2002) *Skeletal muscle mitochondrial free-fatty-acid content and membrane potential sensitivity in different thyroid states: involvement of uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase.* FEBS Lett. **4**; **532**(1-2):12-6.
- Loschen G.; Flohe L.; Chance B. (1971) *Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria.* FEBS Lett. **18**: 261-264.
- Loschen G.; Azzi A.; Richter C.; Flohè L. (1974) *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide.* FEBS Letters **42**: 68-72.

- [Madsen K.; Ertbjerg P.; Djurhuus M.S.; Pedersen P.K.](#) (1996) *Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery.* Am J Physiol. **271**:E1044-50.
- Martensson M.J.; Lai J.C.K.; Meister A.** (1990) *High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 7185-7189.
- McCormack J. G.; Halestrap A. P.; Denton R. M.** (1990) *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism.* Physiol. Rev. **70**: 391-426.
- McCully K.; Faulkner J. A.** (1985) *Injury to skeletal muscle fibres of mice following lengthening contractions.* J. Appl. Physiol. **59**: 119-126.
- Meister A.; Anderton M. E.** (1983) *Glutathione.* Annu. Rev. Biochem. **52**: 711-760.
- Nègre-Salvayre A.; Hirtz C.; Carrera G.; Cazenave R.; Trolly M.; Salvaure R.; Pènicaud L.; Casteilla L.** (1999) *A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation.* FASEB J. **11**: 809-815.
- Nicholls D.G.; Locke R.N.** (1982) *Thermogenic mechanisms in brown fat.* Physiol. Rev. **61**: 1-64.
- Nicholls D.G.** (1997) *The non-ohmic proton leak-25 years on.* Biosci. Rep. **17**: 251-257.
- Nishiki K.; Ericinska M.; Wilson D. F.; Cooper S.** (1978) *Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats.* Am. J. Physiol. **235**: C212-C219
- Nohl H.; Jordan W.; Hegner D.** (1981) *Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO.* FEBS Lett. 1981 Jan 26; **123**(2): 241-4.
- Oppenheimer J.H.; Schwartz H.L.; Mariash C.N.; Kinlaw W.B.; Wong N.C.W.; Freake H.C.** (1987) *Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular levels.* End. Rev. **8**: 288-308.
- Pacifici R.E.; Davis K.J.A.** (1990) *Protein degradation as an index of oxidative stress.* Methods Enzymol. **186**: 485-502.
- Pardrige W.M.** (1970) *Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones.* Am. J. Physiol. **252**:E157.
- Perez A.C.; Cabral de Oliveira A.C.; Estevez E.; Molina A.J.; Prieto J.G.; Alvarez A.I.** (2003) *Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats.* Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. **134** (2): 199-206.
- Qian Z.M.; Xiao D.S.; Ke Y.; Liao Q.K.** (2001) *Increased nitric oxide is one of the causes of changes of iron metabolism in strenuously exercised rats.* Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. **280** (3): R739-743.
- Radi R.; Rodriguez M.; Castro L.; Telleri R.** (1994) *Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite.* Arch. Biochem. Biophys. **308**: 89-95.
- Rajguru S.U.; Yeargans G.S.; Seidler N.W.** (1993) *Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulfhydryls.* Life Sci. **54**: 149-157.
- Reid M.B.** (1996) *Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle.* News Physiol Sci **11**: 114-119.
- Reznick A.Z.; Packer L.** (1994) *Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay.* Methods Enzymol. **233**: 357-363.
- [Ricquier D., Bouillaud F.](#) (2000) *The uncoupling protein homologues: UCPI, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP.* Biochem J. **345**:161-79.
- Rivett A.J.** (1986) *Regulation of intracellular protein turnover: Covalent modifications as a mechanism of marking proteins for degradation.* Curr. Top Cell. Regl. **38**: 291-336.
- Roberts C.K.; Barnad R.J.; Jasman A.; Balon T.W.** (1999) *Acute exercise increases nitric oxide synthase activity, in skeletal muscle.* Am J. Physiol. **277**: E390-E394.
- Roodyn D.B.; Freeman K.B.; Tata J.R.** (1965) *The stimulation by treatment in vivo with tri-iodothyronine of amino acid incorporation into protein by isolates rat-liver mitochondria.* Biochem. J. Mar **94**:628-41.

- Robyr D.; Wolffe A.P.; Wahli W.** (2000) *Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks.* *Molecular Endocrinology* **14**:329-347.
- Sacher G.A.** (1977) *Life table modification and life prolongation.* In: *Handbook of the Biology of Aging*, pp. 582-638, Finch C. E. and Hajflick L. (eds), Van Nostrand Reinhold, New York.
- Scarpulla R.C. ; Kilar M.C.; Scarpulla K.M.** (1996) *Coordinate induction of multiple cytochrome c mRNAs in response to thyroid hormone.* *Journal of Biological Chemistry* **261**:4660-4662.
- Scarpulla R.C.** (2002) *Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis.* *Biochimica et Biophysica Acta* **1576**:1-14.
- Schild L.; Reinheckel T.; Wiswedel I.; Augustin W.** (1997) *Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification.* *Biochem. J.* **328**:205-210.
- Segal J.; Ingbar S.H.** (1982) *Specific binding sites for triiodothyronine in the plasma membrane of rat tymocytes: correlation with biochemical responses.* *J. Clin. Invest.* **70**: 919-926.
- Salo D.C.; Donovan C.M.; Davies K.J.A.** (1991) *HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise.* *Free Radical Biol. Med.* **11**: 239-246.
- Shigenaga M.K.; Park J.W.; Kundy K.C.; Gimeno C.J.; Ames B.N.** (1990) *In vivo oxidative DNA damage: Measurement of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* *Methods Enzymol.* **186**: 521-530.
- Sjodin B.; Westing Y.H.** (1990) Apple F.S.: *Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise.* *Sports Med.* **10**: 236-254.
- Skulacev V.P.** (1996b) *Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanism to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell.* *FEBS Lett.* **397**: 7-10.
- Sies H.** (1991) *Oxidative stress :oxidants and antioxidants.* London Academic Press.
- Simon L.M.; Robin E.D.** (1971) *Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption.* *Int. J. Biochem.* **2**: 560-573.
- Stadtman, E.R.** (1986) *Oxidation of proteins by mixed-function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function.* *Trends Biochem. Sci.* **11**:11-12.
- Sterling K.** (1979) *Thyroid hormone action at the cell level.* *N. Engl. J. Med.* **300**: 117-123.
- Stuart J.A.; Cadenas S.; Jekabsons M.B.; Roussel D.; Brand M.D.** (2001) *Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues.* *Biochim Biophys Acta.* **1504** (1): 144-158.
- Talboy D.A.; Lambert A.J.; Brand M.D.** (2004) *Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial Complex I leads to activation of uncoupling protein 3.* *FEBS Lett.* **556**: 111-115.
- Tapia G.; Cornejo P.; Fernández V.; Vilela L.A.** (1999) *Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation.* *Toxicol Lett.* **106**: 209-214.
- Tappel A.L.** (1972) *Vitamin E and free radical peroxidation of lipids.* *Ann NY Acad. Sci.* **203**: 12-28.
- Tietze G.** (1969) *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.* *Anal Biochem.* **27**(3):502-22.
- Turrens J.F.; Alexandre A.; Lehninger A.L.** (1985) *Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria.* *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 408-414.
- Turrens J.F.** (2003) *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* *J. Physiol* **552**: 335-344.
- Tyler D.D.** (1992) *The Mitochondria in Health and Disease.* New York, VCH.
- Venditti P.; Di Meo S.** (1996) *Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats.* *Arch. Biochem. Biophys.* **331**: 63-68.

- Venditti P.; Di Meo S.; De Leo T. (1996) *Effect of thyroid state on characteristics determining the susceptibility to oxidative stress of mitochondrial fractions from rat liver*. Cell. Physiol. Biochem. **6**: 283-295.
- Venditti P.; Di Meo S. (1997) *Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats*. Int. J. Sports Med. **18**: 497-502.
- Venditti P.; Balestrieri M.; Di Meo S.; De Leo T. (1997) *Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissue*. J. Endocrinol. **155**:151-157.
- Venditti P.; Daniele M.C.; Masullo P.; Di Meo S. (1999) *Antioxidants-sensitive triiodothyronine effects on characteristics of rat liver mitochondrial population*. Cell. Physiol. Biochem. **9**:38-52.
- Venditti P.; Masullo P.; Di Meo S. (1999) *Effect of exercise duration on characteristic of mitochondrial population from rat liver*.
- Venditti P.; Masullo P.; Agnisola C.; Di Meo S. (2000) *Effect of vitamin E on the response to ischemia-reperfusion of Langendorff heart preparations from hyperthyroid rats*. Life Sci. **66**: 697-708.
- Venditti P.; Masullo P.; Di Meo S. (2001) *Hemoproteins affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal from rat tissues*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. **33**: 293-301.
- Venditti P.; Puca A.; Di Meo S. (2003) *Effect of thyroid state on rate sites of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rat skeletal muscle mitochondria*. Arch. Biochem. Biophys. **411**: 121-128.
- Venditti P.; De Rosa R.; Di Meo S. (2003) *Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues*. Free Radic. Biol. Med. **35**: 485-494.
- Venditti P.; De Rosa R.; Cigliano L.; Agnisola C.; Di Meo S. (2004) *Role of nitric oxide in the functional response to ischemia-reperfusion of heart mitochondria from hyperthyroid rats*. Cell. Mol. Life Sci. **61**: 2244-2252.
- Venditti P.; De Rosa R.; Caldarone G.; Di Meo S. (2005) *Effect of prolonged exercise on oxidative damage and susceptibility to oxidants of tissues I severe hyperthyroidism*. Arch. Biochem. Biophys. **442**(2): 229-237.
- Vercesi A. E.; Kowaltowski A. J.; Grijalba M. T.; Meinicke A. R.; Castilho R. F. (1997) *The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition*. Bioschi Rep. **17**(1): 43-52.
- Vesce S.; Jakobsons M.B.; Johnson-Caldwell L.I.; Nicholls D.G. (2005) *Acute glutathione depletion restricts mitochondrial ATP export in cerebellar granule neurons*. J. Biol. Chem. **280**: 38720-38728.
- Videla L.A. (2000) *Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences*. Redox Rep **5**(5): 265-275.
- Visser T.J. in: Coke B.A.; King R.J.B.; and Van der Molen H.J. (1988) Elsevier, Amsterdam.
- Wersterblad H.; Lee J.A.; Lannergren J.; Allen D.G. (1991) *Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle*. Am. J. Appl. Physiol. **261**: C195-C209.
- Wolff S.P. (1986) *Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis*. Biochem. J. **234**: 399-403.
- Yu B.P. (1994) *Cellular defences against damage from reactive oxygen species*. Physical. Rev. **74**: 139-162.
- Zhang Y.; Marcillat O.; Giulivi C.; Ernester L.; Davies K.J. (1990) *The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase*. J. Biol. Chem. **265**: 16330-16336.
- Zhang Y.; Lazar M.A. (2000) *The mechanism of action of thyroid hormones*. Annual Review of Physiology **62**:439-466.

# *PUBBLICAZIONI*

**Venditti P.; Bari A.; Di Stefano L.; Di Meo S.** (2007) Vitamin E attenuates cold-induced rat liver oxidative damage reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial release. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**(9):1731-42.

**Venditti P.; Bari A.; Di Stefano L.; Di Meo S.** (2007) Role of mitochondria in exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle from hyperthyroid rats. *Arch Biochem Biophys.* Jul 1;**463**(1):12-8.

**Venditti P.; Bari A.; Di Stefano L.; Agnisola C.; Di Meo S.** (2008) *Effect of T3 treatment on the response to ischemia-reperfusion of heart preparations from sedentary and trained rats.* *Pflugers Arch.* 2008 Jan; **455**(4):667-76.

**Venditti P.; Bari A.; Di Stefano L.; Di Meo S.** (2008) *Tri-iodothyronine treatment differently affects liver metabolic response and oxidative stress in sedentary and trained rats.* *J Endocrinol.* Apr; **197**(1):65-74.

# *INDICE*

<b>PREMESSA</b>	<i>pag. 3</i>
<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 5</i>
Specie reattive dell'ossigeno	<i>pag. 6</i>
Siti di produzione dei radicali liberi	<i>pag. 9</i>
Danni da radicali liberi	<i>pag. 11</i>
Antiossidanti	<i>pag. 13</i>
Stress ossidativo	<i>pag. 17</i>
Ormoni tiroidei	<i>pag. 18</i>
Ipertiroidismo e stress ossidativo	<i>pag. 20</i>
Esercizio acuto e stress ossidativo	<i>pag. 24</i>
Eterogeneità della popolazione mitocondriale	<i>pag. 27</i>
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<i>pag. 29</i>
<b>MATERIALI &amp; METODI</b>	<i>pag. 31</i>
Animali	<i>pag. 32</i>
Procedura sperimentale	<i>pag. 33</i>
Isolamento dei mitocondri di muscolo scheletrico	<i>pag. 34</i>
Dosaggio proteico	<i>pag. 34</i>
Attività dell'enzima citocromo ossidasi	<i>pag. 35</i>
Consumo di O <sub>2</sub>	<i>pag. 36</i>
Rilascio mitocondriale di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag. 37</i>
Capacità di rimozione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag. 38</i>
Danno ossidativo ai lipidi	<i>pag. 39</i>
Danno ossidativo alle proteine	<i>pag. 40</i>
Dosaggio dell'ossido nitrico	<i>pag. 42</i>
Determinazione dei livelli degli antiossidanti	<i>pag. 43</i>
Attività enzimatica degli enzimi GPX e GR	<i>pag. 45</i>
Suscettibilità allo stress ossidativo	<i>pag. 46</i>
Analisi statistica	<i>pag. 48</i>
<b>RISULTATI</b>	<i>pag. 49</i>

Stima dello stato tiroideo	<i>pag.</i> 50
Resistenza all'esercizio	<i>pag.</i> 52
Attività dell'enzima citocromo ossidasi	<i>pag.</i> 52
Consumo di O <sub>2</sub>	<i>pag.</i> 55
Velocità di rilascio mitocondriale di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag.</i> 60
Capacità di rimozione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag.</i> 62
Danno ossidativo tessutale e mitocondriale	<i>pag.</i> 64
Antiossidanti	<i>pag.</i> 67
Risposta allo stress ossidativo	<i>pag.</i> 70
<b>DISCUSSIONE</b>	<i>pag.</i> 73
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag.</i> 82
<b>PUBBLICAZIONI</b>	<i>pag.</i> 89
<b>INDICE</b>	<i>pag.</i> 91